

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Filogeografía de *Systrophia helicycloides*:**

el reflejo de la dinámica del bosque lluvioso tropical en los genes  
16S rRNA y COI de moluscos terrestres

**TESIS**

para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular

**AUTOR**

Pedro Eduardo Romero Condori

**ASESORA**

Rina L. Ramírez Mesias

**Lima – Perú**

**2010**

*"In the end, we will conserve only what we love; we will love only what we understand; and we will understand only what we are taught."*

(Baba Dioum, 1968)

Para Katherine  
*¡buenas salenas!*

## AGRADECIMIENTOS

A Emma, por continuar apoyándome en esta aventura, día tras día, y a Pedro por acompañarme ahora desde un buen lugar, para toda la vida.

A la Dra. Rina Ramírez, por enseñarme a buscar las preguntas, y encontrar las respuestas a este “misterio de los misterios”, tal como llamaba Charles Darwin al origen de las especies. Es una suerte tenerla como referente académico, y más aún como ejemplo de vida.

Este trabajo pudo ser realizado gracias al apoyo de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a través del Vicerrectorado de Investigación y el Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi que aprobaron los proyectos: “Evaluación de la biodiversidad de moluscos en la región del río Bajo Madre de Dios”, “Diversidad genética en la Amazonia: Polimorfismo del genoma mitocondrial de moluscos terrestres de la familia Systrophiidae” y “Biodiversidad de la Familia Systrophiidae (Mollusca, Gastropoda) en la cuenca del Río Los Amigos (Dpto. Madre de Dios).

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), por la beca para finalizar mis estudios de maestría, fue un honor ser elegido en este grupo de jóvenes profesionales peruanos ganadores de una beca de posgrado en 2008, esta tesis es un sincero esfuerzo para retribuir la confianza y el apoyo prestado.

A la Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica / Amazon Conservation Association (ACCA/ACA), y en especial a Nigel Pitman (ex-Director Científico de ACCA), por el *seed grant* otorgado a los investigadores argentinos Dr. Cristián Ituarte y Dra. Gabriela Cuezco así como a la Dra. Rina Ramírez, en el marco del proyecto “*Inventory of Molluscs assemblages in the Los Amigos watershed – Peru*” que se convirtió en mi primera oportunidad de conocer el bosque amazónico y a mi especie de estudio. Además, el *research grant* que se me concedió fue fundamental para la realización de esta tesis, principalmente por el apoyo moral y logístico prestado en la Concesión de Conservación del Río Los

Amigos (CICRA). También debo agradecer a la Inkaterra Asociación (ITA), en particular al Blgo. José Purisaca, por la gran ayuda prestada en las localidades del Bajo Madre de Dios, y a la Dirección Forestal y de Fauna Silvestre del Ministerio de Agricultura por las autorizaciones de colecta.

El estatus de estudiante de posgrado me permitió también participar en congresos y cursos nacionales e internacionales. En particular, debo agradecer a la Red de Macrouniversidades de Latinoamérica y el Caribe (RedMacro) por el apoyo para realizar una estancia de investigación en el Laboratorio de Genética y Evolución Molecular de Aves de la Universidade de São Paulo (USP) – Brasil, a la Red de Genética de la Conservación (REGENEC) por elegirme para asistir al “IV Taller Latinoamericano de Genética para la Conservación” en la Universidad de Chile, y a la European Molecular Biology Organization (EMBO) por el curso “*Advanced methods for phylogenetic analyses of molecular sequences*” en Rio de Janeiro - Brasil.

A mis amigos del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía – Facultad de Ciencias Biológicas y del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Jenny Chirinos, Carlos Congrains, y en especial a Víctor Borda por su invaluable ayuda en las salidas de campo y el manejo de muestras. Al Dr. Pablo Ramírez y los amigos del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM por su importante colaboración.

Son muchas más las personas e instituciones a agradecer, lo cual sólo corrobora el enorme e invaluable apoyo otorgado para esta investigación. Obtener el grado de Magíster no sólo implicó incrementar mis conocimientos sino también tener un mayor y mejor panorama de mundo académico. Por ello, para todos ustedes:

¡Muchas Gracias!

# CONTENIDO

	Pág.
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
2.1 Posición taxonómica de <i>Systrophia helicycloides</i> (d'Orbigny, 1835) en el del Phylum Mollusca	3
2.2 Aspectos generales de la especie	3
2.3 El DNA mitocondrial y su uso en el estudio de las poblaciones	4
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>7</b>
3.1 Hipótesis	7
3.2 Objetivos	7
3.2.1 Objetivo General	7
3.2.2 Objetivos Específicos	7
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>8</b>
4.1 Área de estudio y colecta	8
4.2 Conservación y preparación del tejido	12
4.3 Extracción de DNA	14
4.4 Amplificación de DNA	14
4.5 Electroforesis de DNA	16
4.6 Secuenciamiento de DNA	16
4.7 Edición y alineamiento múltiple de secuencias	16
4.8 Caracterización de las secuencias	17
4.9 Diversidad genética	17
4.10 Análisis Filogenéticos	18
4.11 Redes de haplotipos ( <i>Networks</i> )	19
4.12 Análisis de estructura poblacional	20
4.13 Patrones Demográficos	20
4.14 Tiempos de Divergencia	20
4.15 <i>Barcoding</i>	22

<b>5. Resultados</b>	<b>23</b>
5.1 Análisis del marcador mitocondrial 16S rRNA	23
5.1.1 Descripción de las secuencias obtenidas	23
5.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias	26
5.1.3 Diversidad Genética	29
5.1.4 Análisis Filogenético	31
5.1.5 Redes de haplotipos ( <i>Networks</i> )	35
5.1.6 Estructura y diferenciación poblacional	37
5.1.7 Patrones Demográficos	39
5.1.8 Tiempos de Divergencia	45
5.2 Análisis del marcador mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I	47
5.2.1 Descripción de las secuencias obtenidas	47
5.2.2 Alineamiento múltiple de secuencias	49
5.2.3 Diversidad Genética	51
5.2.4 Análisis Filogenético	53
5.2.5 <i>Barcoding</i>	55
5.3 Análisis filogenético de los marcadores concatenados	59
<b>6. Discusión</b>	<b>63</b>
6.1 El primer paso: Comparación de Secuencias	63
6.2 Causas de la divergencia intraespecífica	64
6.3 El “misterio de los misterios”	65
6.4 Poca vagilidad: Una espada de doble filo	68
6.5 Estructuración geográfica de la diversidad genética	69
6.6 Demografía Histórica	71
6.7 Los cambios históricos y su efecto en la estructura genética	74
6.8 La dinámica actual del bosque tropical	76
6.9 El reflejo de la dinámica del bosque tropical en los genes mitocondriales de los moluscos terrestres	78
6.10 <i>Barcoding</i>	81
6.10 Conservación	82
<b>7. Conclusiones</b>	<b>84</b>
<b>8. Referencias Bibliográficas</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ubicación de los lugares de colecta. Cuenca del Río Los Amigos y Bajo Madre de Dios. Departamento de Madre de Dios, Perú.	10
Figura 2. Localidades de muestreo. Cuenca del Río Los Amigos.	10
Figura 3. Mapa fisiográfico de la concesión de conservación Los Amigos.	11
Figura 4. Localidades de muestreo. Cuenca del Bajo Madre de Dios.	11
Figura 5. Individuos de <i>Systrophia helicycloides</i> de los diferentes lugares de colecta.	13
Figura 6. Transiciones y tranversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias 16S rRNA de <i>S. helicycloides</i> .	25
Figura 7. Primera porción del alineamiento múltiple (16S rRNA).	26
Figura 8. Porción central del alineamiento múltiple (16S rRNA).	27
Figura 9. Porción final del alineamiento múltiple (16S rRNA).	27
Figura 10. Filogenia NJ de los haplotipos 16S rRNA.	31
Figura 11. Filogenia MP de los haplotipos 16S rRNA.	32



Figura 12. Filogenia ML de los haplotipos 16S rRNA.	33
Figura 13. Filogenia IB de los haplotipos 16S rRNA.	34
Figura 14. Red de haplotipos para el marcador mitocondrial 16S rRNA.	36
Figura 15. Distribución de diferencias a pares ( <i>mismatch distribution</i> ) utilizando todas las secuencias.	42
Figura 16. Distribución de diferencias a pares ( <i>mismatch distribution</i> ) sin considerar a los haplotipos divergentes S10 y S11.	43
Figura 17. Distribución de diferencias a pares ( <i>mismatch distribution</i> ) de los linajes encontrados.	44
Figura 18. Tiempos de divergencia entre los linajes de <i>S. helicycloides</i> .	46
Figura 19. Transiciones y tranversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias COI de <i>S. helicycloides</i> .	48
Figura 20. Porción del alineamiento múltiple de secuencias COI.	49
Figura 21. Filogenia NJ para los haplotipos COI.	53
Figura 22. Filogenia MP de los haplotipos COI.	54
Figura 23. Filogenia ML de los haplotipos COI.	54
Figura 24. Filogenia IB de los haplotipos COI.	55
Figura 25. Códigos de barras observados en la base de datos BOLD.	55

Figura 26. Distancias intraespecíficas considerando todas las secuencias COI (a) y sin considerar a los haplotipos C5 y C6 (b).	56
Figura 27. Resultados al comparar las secuencias con las bases de datos del BOLD.	57
Figura 28. Resultados al comparar el haplotipo C4 con la COI FULL DATABASE del BOLD.	58
Figura 29. Resultados al comparar el haplotipo C5 con la COI FULL DATABASE del BOLD.	58
Figura 30. Filogenia NJ de los marcadores concatenados.	60
Figura 31. Filogenia MP de los marcadores concatenados.	60
Figura 32. Filogenia ML de los marcadores concatenados.	61
Figura 33. Filogenia IB de los marcadores concatenados.	61
Figura 34. Individuos de <i>Systrophia helicycloides</i> de los diferentes haplotipos encontrados.	67
Figura 35. Comparación del posible evento de expansión poblacional con las condiciones climáticas presentes hace 200 mil años.	73
Figura 36. Divergencia entre los linajes de <i>S. helicycloides</i> comparada con los cambios geológicos y climáticos ocurridos durante los últimos 10 millones de años.	80

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ubicación geográfica de los lugares de colecta.	9
Tabla 2. Distancia lineal (en kilómetros) entre las localidades de colecta.	9
Tabla 3. Frecuencia de bases (16S rRNA).	23
Tabla 4. Resultados de comparación con BLASTn (16S rRNA).	24
Tabla 5. Sitios polimórficos informativos (16S rRNA).	28
Tabla 6. Distribución de los haplotipos del 16S rRNA de <i>S. helicycloides</i> .	29
Tabla 7. Haplotipos 16S rRNA de <i>Systrophia helicycloides</i> .	30
Tabla 8. Distancias genéticas (16S rRNA).	30
Tabla 9. Valores de $\phi_{st}$ entre las localidades muestreadas.	37
Tabla 10. Valores de $\phi_{st}$ entre las localidades muestreadas, sin considerar a los haplotipos altamente divergentes.	38
Tabla 11. Valores de $\phi_{st}$ entre las regiones estudiadas.	38
Tabla 12. Estadísticos de diversidad genética.	40
Tabla 13. Valores del estadístico $F_s$ de Fu.	41
Tabla 14. Valores de divergencia entre los linajes de <i>S. helicycloides</i> .	45

Tabla 15. Resultados de comparación de las secuencias COI con BLASTn.	47
Tabla 16. Frecuencia de bases nitrogenadas (COI) para cada población de <i>Systrophia helicycloides</i> .	48
Tabla 17. Sitios polimórficos informativos en el alineamiento múltiple de secuencias COI.	50
Tabla 18. Distribución de los haplotipos COI dentro de las localidades muestreadas.	51
Tabla 19. Distancia genética (K2P) para el marcador COI.	51
Tabla 20. Sitios polimórficos en los 6 haplotipos COI.	52
Tabla 21. Individuos de <i>S. helicycloides</i> utilizados en el análisis con los marcadores concatenados.	59

## RESUMEN

*Systrophia helicycloides* (d'Orbigny, 1835) es un molusco terrestre con amplia distribución en la cuenca de los ríos Los Amigos y Bajo Madre de Dios (Dept. Madre de Dios, Perú), que habita principalmente zonas inundables. Su distribución asociada a su poca vagilidad la hace un modelo para el estudio de la inferencia de procesos biogeográficos en la Amazonia peruana a partir de la estructura genética de sus poblaciones. El objetivo principal de esta investigación fue determinar la relación entre la estructura genético-poblacional del molusco y los cambios dinámicos que ocurren en el bosque lluvioso tropical. Para ello se realizaron colectas en las zonas de Los Amigos (CICRA. CM1) y Bajo Madre de Dios (estaciones de la Asociación Inkaterra en Palmereto, Gamitana y Concepción). Los individuos vivos fueron utilizados para la extracción de DNA total a partir del tejido muscular del pie. Se amplificaron y secuenciaron porciones de los genes mitocondriales 16S (subunidad mayor del rRNA) y COI (Citocromo c oxidasa subunidad I). Se obtuvieron 46 secuencias para un fragmento del gen 16S rRNA y 9 para COI. El alineamiento múltiple de secuencias del 16S rRNA presentó 353 posiciones de las cuales 190 eran sitios conservados, 119 variables y 69 sitios informativos; para el caso de COI se obtuvieron 706 sitios, 513 posiciones conservadas, 193 variables y 124 informativas. Las relaciones filogenéticas intraespecíficas mostraron la presencia de tres linajes diferentes dentro de las poblaciones de *S. helicycloides*: (1) Linaje 1 con haplotipos restringidos a una cuenca o distribuidos en ambas, (2) Linaje 2 con haplotipos principalmente de la cuenca de Los Amigos, y (3) Linaje 3 con haplotipos altamente divergentes provenientes de la zona de Inkaterra (Palmereto). No existe una fuerte estructura geográfica de la diversidad genética. La estructura genética encontrada ha sido provocada por los cambios dinámicos en el bosque tropical. Los cambios geoclimáticos históricos habrían producido la diferenciación entre los linajes y la dinámica actual representada por los ríos amazónicos puede haber influenciado la distribución de la diversidad genética.

**Palabras Clave:** 16S rRNA, COI, filogeografía, Pleistoceno, *Systrophia helicycloides*.

## ABSTRACT

*Systrophia helicycloides* (d'Orbigny, 1835) is a land snail species which occurs in floodplains and presents a wide distribution in Los Amigos and Bajo Madre de Dios basins (Madre de Dios, Peru). *S. helicycloides* distribution and low vagility could be use to infer biogeographical processes in the Peruvian Amazon based on its genetic population structure. The aim of this work is to determine the relationship between mollusk's genetic population structure and dynamic changes that have taken place in the rain tropical forest. Thus, *S. helicyloides* was collected from Los Amigos (CICRA, CM1) or Bajo Madre de Dios (Inkaterra stations at Palmereto, Gamitana, and Concepción). Total DNA was isolated and mitochondrial genes 16S rRNA and COI were amplified and sequenced. I obtained 46 sequences from 16S rRNA and 9 from COI. Multiple sequence alignment of 16S rRNA consist in 353 positions (190 conserved, 119 variable, and 69 informative), for COI alignment length was 706 sites (513 conserved, 103 variable, and 124 informative). Intraespecific relationships showed three lineages in *S. helicycloides*: (1) Lineage 1, with restricted or wide-distributed haplotypes, (2) Lineage 2, with haplotypes mainly from Los Amigos, and (3) Lineage 3, with extremely divergent haplotypes mainly from Palmereto. There is not a strong geographical structure of the genetic diversity. Dynamic changes produced the actual genetic structure in *S. helicycloides*. Historical geoclimatic changes could have produced lineage differentiation and river dynamics could have influenced the distribution of the genetic diversity.

**Keywords:** 16S rRNA, COI, phylogeography, Pleistocene, *Systrophia helicycloides*.

# 1. INTRODUCCIÓN

El bosque lluvioso tropical es un sistema dinámico, esto se refleja en la diversidad de especies y hábitats (Whitmore, 1998). Este bosque es afectado por cambios climáticos y geológicos que pueden ser seguidos observando el patrón genético de algunos taxa que presentan escalas espaciales finas y poca vagilidad (Hugall *et al.*, 2002). Estas características hacen que los moluscos terrestres sean buenos candidatos para estudiar los procesos de biogeografía histórica.

Existe una urgente necesidad de investigar en los trópicos para conocer y entender la diversidad de los moluscos terrestres, y casi cualquier grupo de invertebrados (Solem, 1984). Los invertebrados representan más del 99% de la diversidad animal, siendo los moluscos el segundo *phylum* más diverso (Lydeard *et al.*, 2004) y ocupando un lugar trófico importante en la pirámide ecológica de energía. Sin embargo, la mayoría de estudios de conservación en el bosque húmedo tropical se ha enfocado principalmente en grupos de vertebrados. Se conoce muy poco acerca de la historia natural de los moluscos de Sudamérica; es más, en la familia Scolodontidae, una familia de moluscos terrestres carnívoros endémicos de Sudamérica, sólo existe un trabajo que ha revisado en conjunto su taxonomía, sistemática y biogeografía (Ramírez, 1993).

Uno de los componentes de la diversidad biológica es la diversidad genética, la cual comprende la variabilidad genética entre individuos y poblaciones (Primack y Rodrigues, 2001). La importancia del estudio de la diversidad genética fue remarcada en la Cumbre de las Naciones Unidas sobre el Ambiente y el Desarrollo en Río de Janeiro en 1992 (CDB, 1992). Además, las conclusiones de esta conferencia fueron ratificadas por el Estado peruano, el cual se ha comprometido en la conservación de la biodiversidad (Constitución Política del Perú: Artículo 68, 1993).

El DNA mitocondrial (mtDNA) se ha convertido en un componente clave para desarrollar estudios en biogeografía y conservación a nivel molecular (Avise, 1996). El mtDNA tiene características especiales que lo diferencian de otros marcadores moleculares (Avise *et al.*, 1987). Estas son: (1) Una alta tasa de mutación la cual es usada para estudiar el análisis de la estructura genética de las poblaciones, (2) no presenta recombinación y (3) se transmite a través de las generaciones sólo por la vía materna por lo que puede ser usado en el estudio de las relaciones filogenéticas y evolutivas (Avise, 2004). La investigación de la relación entre la estructura genética de una especie con respecto a su distribución geográfica ha dado paso a una nueva disciplina denominada "Filogeografía" (Avise, *et al.*, 1987; Avise, 2000), la cual tiene un rol importante en el estudio de la conservación de especies y hábitats (Moritz, 1994).

*Systrophia* (Pfeiffer, 1855) es un género de moluscos terrestres perteneciente a la familia Systrophiidae (Thiele, 1926, 1927), ahora Scolodontidae (Baker, 1925) (ver Haudorsf, 2006). *Systrophia* presenta su diversidad más alta en el Perú, encontrándosele entre la cuenca amazónica y los Andes (10-3300 msnm). Durante mi participación en el proyecto "*Inventory of Mollusca assemblages in the Los Amigos watershed*" en el Centro de Investigación de la Cuenca del Río Los Amigos (CICRA) – Madre de Dios, pude apreciar que la especie *Systrophia helicycloides* tenía una amplia distribución en varias zonas de la Reserva de Los Amigos. En un proyecto posterior se amplió la zona de colecta hacia la cuenca del Bajo Madre de Dios (Inkaterra – Reserva Amazónica). Esta amplia distribución asociada con su baja vagilidad la convierte en un modelo interesante para estudiar cómo los procesos biogeográficos pueden ser inferidos analizando la estructura genética de sus poblaciones.

El uso de nuevas técnicas basadas en DNA conllevará a un mejor entendimiento de la biogeografía de los moluscos terrestres en el bosque húmedo tropical peruano. Además, nos permitirá conocer cómo los cambios dinámicos del bosque pueden ser reflejados en la estructura genético-poblacional de la especie. Adicionalmente, este trabajo servirá de referencia para futuras investigaciones de biogeografía histórica y conservación para otras especies de la Amazonia.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Posición taxonómica de *Systrophia helicycloides* (d'Orbigny, 1835) en el *phylum* Mollusca

- Phylum: Mollusca
- Clase: Gastropoda
- Orden: Pulmonata
- Superfamilia: Rhytidacea
- Familia: Scolodontidae
- Género: *Systrophia*
- Especie: *Systrophia helicycloides*

### 2.2 Aspectos generales de la especie

La familia Systrophidae (=Scolodontidae) es endémica del Neotrópico, existiendo pocos estudios, principalmente taxonómicos (revisados en Ramírez, 1993), conociéndose a la mayoría de las especies y géneros sólo por la descripción de la concha. Existen aún problemas taxonómicos a nivel de familia para el grupo en estudio (Ramírez *et al.*, *in press*), Thiele (1927) agrupó a las especies de sistrófidos a partir de una sinapomorfia de la rádula. Por otro lado Baker (1925), creó la familia Scolodontidae para incluir la mayoría de géneros de Systrophidae. Hausdorf (2006) redescubrió a *Scolodonta semperi* (Döring, 1875) colocándola dentro de Systrophidae y renombrando a la familia como Scolodontidae. Según Ramírez (1993), los géneros reconocidos son *Systrophia*, *Wayampia*, *Drepanostomella*, *Happiella*, *Guestieria*, *Happia*, *Miradiscops*, *Tamayoa*, y *Zilchistrophia*.

Los sistrófidos se distribuyen principalmente en Sudamérica a elevaciones desde el nivel del mar hasta 4400 m, algunas especies se encuentran en América Central y las Indias Orientales. Estos moluscos son miembros conspicuos de la biota de los bosques tropicales lluviosos, aunque también son encontrados en bosques secos y pastizales; se alimentan de invertebrados pequeños.

*Systrophia helicycloides* (d'Orbigny, 1835) presenta una concha aplanada de muchas vueltas, con ápex ligeramente hundido, de ombligo amplio y ligeramente superficial; la vuelta corporal en el individuo adulto tiene una depresión a  $\frac{3}{4}$  de vuelta, desde donde se continúa abruptamente más ancha. La concha posee en promedio 13,2 mm de diámetro mayor, 6 mm de altura de la concha, 5 mm de ancho de la abertura, 5 mm de largo de la abertura, 8 mm de diámetro del ombligo, y 8,8 vueltas (Ituarte *et al.*, 2008). Su distribución se restringe a América del Sur, ha sido reportada en Perú (Madre de Dios) y Bolivia. Se encuentra en la hojarasca de áreas boscosas. Es además la especie más común de gasterópodos de la Reserva Los Amigos.

### **2.3 El DNA mitocondrial y su uso en el estudio de las poblaciones**

Una característica propia de los eucariotas es poseer organelos, algunos de los cuales -como los cloroplastos y mitocondrias- poseen genoma propio y son capaces de replicarse autónomamente. Se ha postulado el origen de ambos organelos como producto de la endosimbiosis entre un organismo eucariota y un procariota (Margulis y Sagan, 2001). En el caso de las mitocondrias, luego de la endosimbiosis existió una transferencia de genes desde el organelo hacia el núcleo disminuyendo el tamaño de su genoma (Gray *et al.*, 1999).

El contenido génico del DNA mitocondrial en metazoos celomados es constante: Consiste en 13 genes que codifican proteínas ligadas, principalmente, a los eventos de respiración oxidativa y generación de ATP; 2 genes para la subunidad mayor y menor del RNA ribosomal y 22 genes de RNA de transferencia (Hatzoglou *et al.*, 1995).

Los moluscos terrestres poseen una baja habilidad de dispersión permitiendo preservar en su genoma los patrones de diversidad genética y convirtiendo a estas especies en organismos ideales para el estudio filogeográfico (Pfenninger *et al.*, 2003). Aunque algunas especies de moluscos terrestres tienen una distribución cosmopolita, el rango de distribución de la mayoría es restringido debido a sus requerimientos de hábitat particulares y baja dispersión.

Estas características previenen a los moluscos terrestres de escapar a las condiciones cambiantes en los ecosistemas (Pfenninger y Posada, 2002). Además, las conchas son bien preservadas lo que permite conocer las distribuciones geográficas pasadas, estas cualidades los hacen candidatos para estudiar los procesos evolutivos (Pfenninger y Magnin, 2001).

El gen mitocondrial 16S rRNA (subunidad mayor ribosomal), es un gen extremadamente importante en todos los organismos siendo una de las regiones del genoma mitocondrial más conservadas. En moluscos terrestres posee alrededor de 1300 pares de bases, se encuentra flanqueado hacia el extremo 5' por el gen de la citocromo c oxidasa subunidad I (COI), y hacia el extremo 3' se encuentra el gen que codifica la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa (NADH 6) (Hatzoglou *et al.*, 1995). Su tasa de cambio evolutivo ha sido calculada para varios organismos (Chiba, 1999) lo que permite su uso en el estudio de filogenias interespecíficas. Por otro lado, existen regiones dentro de este gen que poseen una tasa de mutación más elevada lo que también permite su uso en el estudio de filogenias intraespecíficas. Por ello, este gen se ha convertido en uno de los principales segmentos utilizados en el estudio de poblaciones de moluscos terrestres.

Como ejemplos tenemos el estudio de Chiba (1999) que demostró la rápida evolución en las secuencias del DNA mitocondrial entre moluscos del género *Mandarina* que habitan las islas del Océano Pacífico, encontrando que la radiación adaptativa en hábitats fragmentados conlleva a una gran diferenciación de caracteres morfológicos y genéticos. Ross (1999), quien reportó una relación entre la distancia genética y geográfica del molusco *Discus macclintocki*, además de una alta diversidad genética en una región de 4000 km<sup>2</sup> debido a la presencia de corrientes de agua que permitieron el desplazamiento de los individuos y el flujo génico entre las poblaciones; y Ramírez (2004), quien hizo el primer estudio general de la sistemática y filogeografía de moluscos terrestres de las lomas de la costa peruana, haciendo una revisión de la taxonomía del grupo, y encontrando patrones demográficos relacionados al ENSO.

El gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) se utiliza también para estudios de filogenia y genética poblacional; además de ello, se ha convertido en una de las moléculas claves para resolver uno de los problemas más antiguos de la Biología: la identificación de especies. La utilización de una metodología basada en secuencias de DNA para identificar especies podría agilizar, facilitar y economizar el proceso de identificación de las especies (Tautz *et al.*, 2003).

De esta manera se llega al concepto de *DNA Barcode*, una secuencia de DNA corta que permita identificar las especies de manera objetiva (Hebert *et al.*, 2003). Un segmento del gen COI de aproximadamente 700 bp y cercano al extremo 5' fue elegido debido a la existencia de *primers* universales (Folmer *et al.*, 1994) y una alta tasa de mutación en la tercera posición de los codones, que le confiere una posibilidad de cambio tres veces mayor a la del otro marcador. Además, esta sección casi no presenta inserciones o deleciones (*indels*), por tanto, los alineamientos son mucho más sencillos de realizar al no presentarse *gaps* (Hebert *et al.*, 2003).

Según el trabajo de Hebert *et al.* (2003, 2004) el límite de divergencia genética entre especies de aves y otros organismos es de 2%. Para el caso del *phylum* Mollusca se ha observado una gran variación en la secuencia COI (de hasta 11%) aunque algunas especies se encuentran diferenciadas por menos del 1%. Un trabajo reciente (Davidson *et al.*, 2009) propone que el límite de divergencia entre las especies de moluscos sería de 4%. La base de datos de códigos de barra de DNA corresponde al *Consortium for the Barcoding of Life* (CBOL) donde existe un protocolo bastante desarrollado para el almacenamiento y análisis de estos datos (Ratnasingham y Hebert, 2007).

Ejemplos de estudios con COI en moluscos terrestres corresponden a Rundell *et al.* (2004), quienes estudiaron especies de Succineidae en Hawaii y Asia, el análisis permitió resolver las relaciones evolutivas dentro de este grupo; o Ketmaier *et al.* (2006), con *Solatopupa* donde los resultados a partir del análisis filogenético de secuencias permitieron resolver problemas antes no abordados por estudios morfológicos o de cariotipo.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

##### **Hipótesis de Trabajo**

H1: Los cambios geoclimáticos que han ocurrido en la cuenca de los ríos Los Amigos y Bajo Madre de Dios están reflejados en la estructura genético-poblacional de *Systrophia helicycloides*.

##### **Hipótesis Nula**

H0: Los cambios geoclimáticos que han ocurrido en la cuenca de los ríos Los Amigos y del Bajo Madre de Dios no están reflejados en la estructura genético-poblacional de *Systrophia helicycloides*.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo General**

Determinar la relación entre la estructura genética de *Systrophia helicycloides* y los cambios dinámicos que han ocurrido en el bosque húmedo tropical de la cuenca de los ríos Los Amigos y Madre de Dios (Madre de Dios - Perú).

##### **3.2.2 Objetivos Específicos**

1. Evaluar la eficacia de los marcadores 16S rRNA y COI para estudios filogeográficos en moluscos terrestres.
2. Evaluar la diversidad genética en las poblaciones de *Systrophia helicycloides* de la cuenca de Los Amigos y del Bajo Madre de Dios.
3. Obtener la filogenia de haplótipos conseguidos en las poblaciones de *Systrophia helicycloides*.
4. Establecer la estructura genética de *Systrophia helicycloides* en la cuenca de los ríos Los Amigos y Bajo Madre de Dios.
5. Relacionar los tiempos de divergencia dentro de la especie con los cambios geoclimáticos ocurridos en la región.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Área de estudio y colecta

En la margen suroeste de la cuenca Amazónica, los ríos que descienden de los Andes hacia la Amazonia son divididos hacia el norte o sur por el Arco de Fitzcarrald, los ríos que van al sur y este del arco de Fitzcarrald fluyen hasta la cuenca del río Madre de Dios. El río Los Amigos forma parte de este sistema de ríos que se dirigen hacia el sur del Arco de Fitzcarrald. Es el sexto río más largo que alimenta al Madre de Dios (Goulding *et al.*, 2003).

El río Los Amigos pertenece al grupo de ríos que forman meandros (como el río Manu), característicos del departamento de Madre de Dios y que provocan la formación de cochas (*oxbow lakes*). Los cambios en la corriente de estos ríos pueden ser repentinos, se ha estimado que los ríos pueden modificar varios kilómetros de su paisaje adyacente en unos cientos de años (Kalliola *et al.*, 1987). Los ríos forman la topografía de la región y por eso las consecuencias biológicas de la dinámica fluvial tienen una importancia especial (Salo *et al.*, 1986).

El clima en la región es templado y con dos estaciones marcadas (Erwin, 1990), entre Octubre y Abril, entre estos meses ocurre más del 80% de la precipitación anual (Barthem *et al.*, 2003). La temporada seca comprende los meses de Mayo, Junio, y Julio (precipitación menor a 80 mm). La precipitación media anual es 2700 mm, un valor mayor a lo encontrado en lugares cercanos como Cosha Cashu (2500 mm), o Puerto Maldonado (2260 mm). El promedio de la temperatura mensual varía entre 20 °C - 26 °C. Para el caso de la zona de Inkaterro se puede tomar como referencia los datos de la zona reservada de Tambopata (Wilkerson y Fairchild, 1984); la precipitación anual varía entre 1500-2000 mm, y la temperatura entre 18 °C - 24 °C.

Los lugares de colecta abarcaron parte de la cuenca del río Madre de Dios, entre los ríos Los Amigos y Bajo Madre de Dios (Fig. 1, Tabla 1 y 2). Se ha utilizado material colectado durante el proyecto "Inventory of Mollusca assemblages in the Los Amigos watershed" desarrollado por los investigadores argentinos Cristián Ituarte (Museo de La Plata) y Gabriela Cuezco (Fundación Miguel Lillo - Tucumán), y Rina Ramírez (Museo de Historia Natural-Perú). El material fue colectado en los límites de la Concesión de Conservación "Los Amigos" en la selva baja de Madre de Dios – Perú, tanto en época seca como de lluvias, y fijado en etanol de 96°. Los puntos de colecta corresponden a las localidades de CICRA (Centro de Investigación del Río Los Amigos) y el centro de monitoreo 1 (CM1) (Fig. 2). En el CICRA se colectó a lo largo de la trocha que conduce hacia Cocha Lobo. En CM1, se colectó entre las trochas Maderero y Pura Vida, cercanas al centro de monitoreo.

**Tabla 1.** Ubicación geográfica de los lugares de colecta, se muestran valores de coordenadas. LS: Latitud Sur, LO: Longitud Oeste

	Coordenadas	
	LS	LO
<b>CM1</b>	12° 34' 17"	70° 04' 09"
<b>CICRA</b>	12° 34' 09"	70° 06' 01"
<b>Concepción</b>	12° 36' 09"	69° 04' 21"
<b>Palmereto</b>	12° 31' 37"	69° 01' 53"
<b>Gamitana</b>	12° 30' 37"	69° 58' 51"

**Tabla 2.** Distancia lineal (en kilómetros) entre las localidades de colecta. Las distancias fueron calculadas utilizando *Google Earth*

	<b>CM1</b>	<b>CICRA</b>	<b>Concepción</b>	<b>Palmereto</b>	<b>Gamitana</b>
<b>CM1</b>	X				
<b>CICRA</b>	3,39	X			
<b>Concepción</b>	108,83	111,14	X		
<b>Palmereto</b>	113,40	116,08	9,51	X	
<b>Gamitana</b>	118,84	121,70	14,19	5,80	X

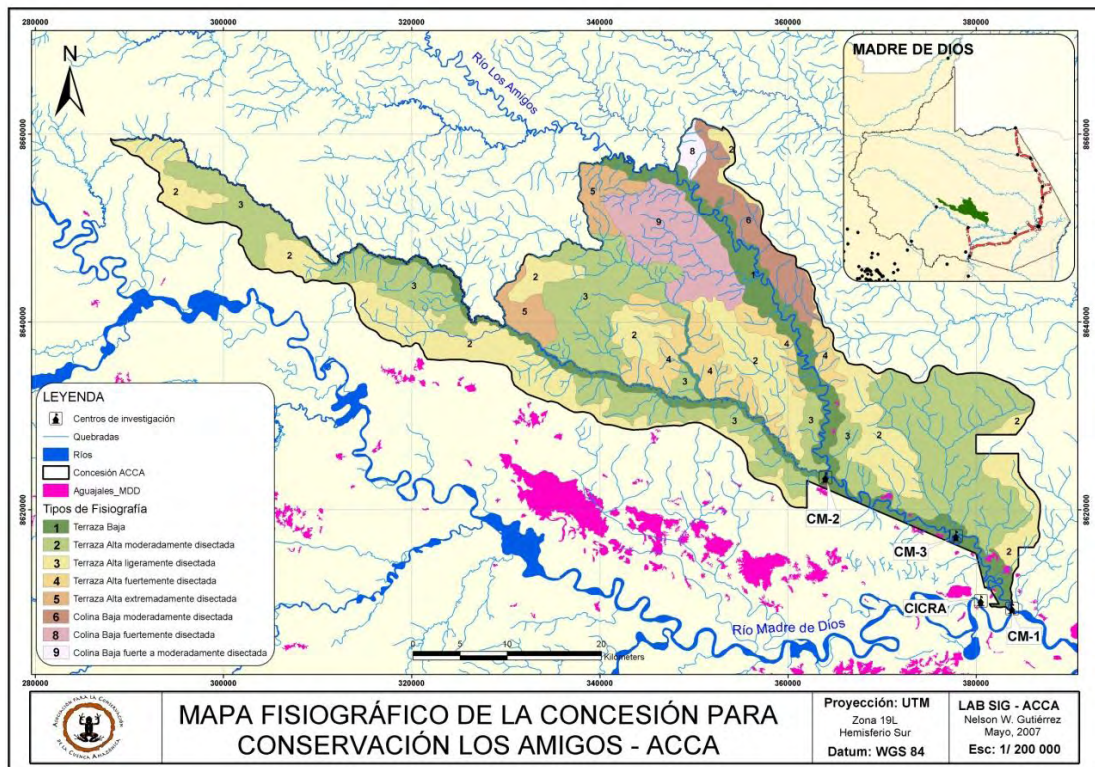


**Figura 1.** Ubicación de los lugares de colecta. Cuenca del Río Los Amigos y Bajo Madre de Dios. Departamento de Madre de Dios – Perú. Modificado de *Google Earth*. La escala representa 20 km.



**Figura 2.** Localidades de muestreo. Cuenca del Río Los Amigos. Se observan las dos zonas de colecta: CICRA y CM1. Modificado de *Google Earth*. La escala representa 1 km.





**Figura 3.** Mapa fisiográfico de la concesión de conservación Los Amigos. Tomado de [www.acca.org.pe](http://www.acca.org.pe).



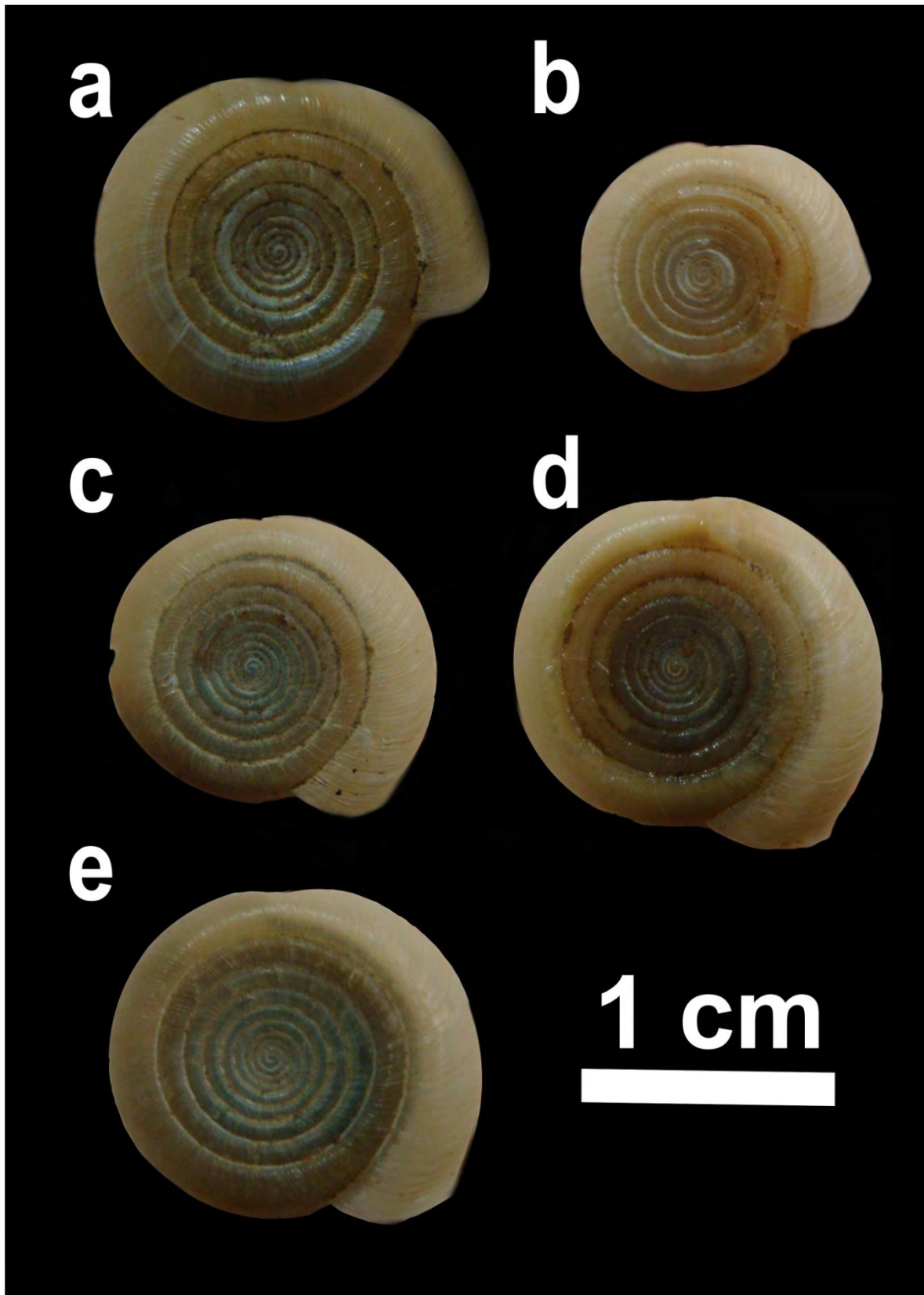
**Figura 4.** Localidades de muestreo. Cuenca del Bajo Madre de Dios. Se observan las tres zonas de colecta: Concepción, Palmereto y Gamitana. Modificado de *Google Earth*. La escala representa 2 km.

La mayoría de localidades de colecta en la zona de Los Amigos se encontraban en la zona denominada como terraza baja, la cual puede ser periódicamente inundada por el río Madre de Dios o el río Los Amigos (Fig. 3). Varias zonas de la Concesión de Conservación del Río Los Amigos fueron anteriormente campamentos mineros.

Se colectó también en la cuenca del Bajo Madre de Dios, las zonas de colecta en esta región pertenecen a la Inkaterri Asociación (ITA) (Fig. 4). La reserva Inkaterri se encuentra adyacente a la Reserva Nacional Tambopata y las locaciones son utilizadas principalmente para turismo ecológico, Aquí se colectó en tres puntos: (1) Hacienda Concepción, que se encuentra hacia la margen derecha del río Madre de Dios y que funciona como centro de ecoturismo, (2) Palmereto, correspondiente a la margen izquierda del río Madre de Dios, se encuentra dentro de Inkaterri Reserva Amazónica, y (3) Chacra Gamitana, que corresponde a otro punto de recreación ecoturística, hacia la margen izquierda del río.

#### **4.2 Conservación y Preparación del tejido**

Se trabajó con tejido muscular del pie del molusco para su posterior extracción de DNA. El tejido del pie fue lavado con agua destilada, y luego con etanol 96°, luego se cortó finamente sobre una placa Petri en porciones de 1-2 mm<sup>3</sup> con un bisturí. Las porciones fueron colocadas en microtubos con 1000 µl de etanol 96° para su conservación. Los especímenes usados se encuentran en el Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Fig. 5).



**Figura 5.** Individuos de *Systrophia helicycloides* de los diferentes lugares de colecta. (a) CICRA, (b) CM1, (c) Concepción, (d) Gamitana, (e) Palmereto. La escala representa 1 cm.



### 4.3 Extracción de DNA

Para la extracción y precipitación de DNA se siguió el protocolo adaptado de Ramírez (2004), el cual utiliza el método CTAB porque permite obtener buenos resultados en la amplificación por PCR al reprimir los mucopolisacáridos inhibitorios presentes en el tejido (Wade y Mordan, 2000). El protocolo fue el siguiente: Las muestras de tejido (1-2 mm<sup>3</sup> de músculo del pie) son colocadas en 300 ul de un *buffer* que contiene 100 mM de Tris/HCl, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 2% de CTAB, 2% de PVP, 0,2% de β-mercaptoetanol, 0,10 mg de Proteinasa K, e incubadas a 60 °C por 2 horas. Las proteínas fueron removidas utilizando 310 ul de cloroformo – alcohol isoamílico (96:4), centrifugando a 15 000 g por 15 minutos, y removiendo la fase acuosa, este paso fue repetido una vez más. Luego, el DNA es precipitado usando 600 ul de etanol de 96 ° frío y 25 ul de Acetato de amonio 3 M, incubando a -20 °C al menos 30 min y centrifugando a 15 000 g por 15 min. El *pellet* obtenido fue lavado en 1 ml de alcohol de 96° y luego centrifugado a 15 000 g por 15 min. Finalmente, el *pellet* fue secado al ambiente por 24 horas para luego ser resuspendido en 50 ul de agua bidestilada y conservado a -20 °C.

### 4.4 Amplificación de DNA

Un segmento de la región 3' del gen mitocondrial 16S rRNA (350 pares de bases aproximadamente) fue amplificado vía la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988).

Se utilizaron los *primers* desarrollados por Ramírez (2004):

**16SF-104** (5'-GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT-3')

**16SR-472** (5'-TCGTAGTCCAACATCGAGGTCA-3')

Cada reacción fue trabajada en un total de 30  $\mu$ l conteniendo 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa, Solución *buffer* 1X, 0,2 mM dNTP, 1,25 mM  $MgCl_2$ , 0,2  $\mu$ M de cada *primer* y 3  $\mu$ l de DNA extraído. Los ciclos de amplificación fueron: Desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación (*annealing*) de los *primers* a 48 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 60 segundos, finalmente una extensión final por 1 minuto. El proceso de amplificación se repitió por 35 ciclos. Como control de la amplificación se utilizó 3  $\mu$ l de agua destilada en vez del DNA, manteniendo tal cual los demás componentes. Cuando la reacción no fue específica y aparecieron bandas múltiples, se procedió a aumentar la temperatura de hibridación.

Si la muestra resultaba positiva se procedía a la amplificación de la citocromo c oxidasa subunidad I (COI) utilizando los *primers* diseñados por Folmer *et al.* (1994) que amplifican 700 pb del extremo 5' del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI):

**LCO 1490** (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

**HCO 2198** (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

Las concentraciones para la amplificación fueron parecidas a las usadas para el 16S rRNA, variando la concentración de los *primers* a 0,3  $\mu$ M. El cambio sustancial fue en las condiciones de temperatura: Desnaturalización inicial de 96 °C por 2 minutos, a continuación 35 ciclos: Desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación de los *primers* a 45 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C durante 60 segundos, este ciclo se repitió 35 veces y culminó con una extensión final a 72 °C por 7 minutos.

Primero se realizó la amplificación del 16S rRNA, ya que este gen presenta una mayor variación intraespecífica en moluscos terrestres (Congrains, 2009), luego de observar las secuencias y ver la variación entre ellas, se seleccionaron individuos de los haplotipos (secuencias diferentes de mtDNA) diferentes, para proceder a la amplificación del COI, este enfoque permitió comparar si las diferencias presentes en el 16S rRNA se correspondían con las diferencias presentes en COI.

#### 4.5 Electroforesis de DNA

Con 4 ul de la muestra amplificada y 2 ul de *buffer* de carga se procedió a una electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8%. Luego se tiñó el gel con bromuro de etidio el cual se intercala entre las hebras de DNA, observándose las bandas a la luz ultravioleta en un transiluminador. En la carga del gel se utilizaron las muestras amplificadas, la muestra control y un marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). La aparición de una única banda por muestra es prueba de la amplificación específica.

#### 4.6 Secuenciamiento de DNA

Fueron seleccionados los individuos que presentaron una amplificación específica, el DNA amplificado fue transferido a un microtubo de 1,5 ml. Este tubo fue rotulado y sellado con *parafilm*. El producto de PCR (volumen mínimo: 20 ul) fue enviado a la compañía MACROGEN USA (Maryland - USA), donde se realizó la purificación del amplificado mediante el uso de perlas magnéticas. Las reacciones de secuenciamiento fueron realizadas en un secuenciador automático ABI 3730xl. Ambas hebras fueron secuenciadas con los mismos *primers* utilizados en la PCR.

#### 4.7 Edición y alineamiento múltiple de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron observadas y editadas con el programa Chromas (McCarthy, 1996). Se obtuvo las secuencias para ambas hebras de DNA para cada individuo, una perteneciente a la hebra molde (F) y otra a la complementaria (R).

Se procedió al ensamblaje de ambas secuencias generándose un "*contig*" o secuencia consenso. El ensamblaje se realizó mediante el software CAP3 (Huang y Madan, 1999). La secuencia consenso obtenida fue guardada en un archivo de texto simple en formato Fasta.

Al conjunto de secuencias de *Systrophia helicycloides* obtenidas se les sumó secuencias de *Systrophia eatoni*, *Systrophia stenostrepta* (proveniente de la localidad de Shatuyacu, Departamento de San Martín, Perú) y *Wayampia* sp. Estas secuencias fueron usadas como grupos externos (*outgroups*). Las secuencias a utilizar fueron luego cargadas en el programa ClustalX 2.0 (Larkin *et al.*, 2007), donde se realizó un alineamiento múltiple.

El alineamiento múltiple de secuencias consiste en la comparación de varias secuencias permitiendo encontrar sitios homólogos. Este análisis es clave en el desarrollo de la investigación.

#### **4.8 Caracterización de secuencias**

Cada secuencia fue comparada con la base de datos *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) por medio de la herramienta BLASTn del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), esta búsqueda permitió comparar la similitud entre las secuencias obtenidas y las almacenadas en la base de datos.

La estimativa de frecuencia de bases fue realizada por medio del software DAMBE (Xia y Xie, 2001), aquí también se realizó la gráfica del número de transiciones y transversiones que ocurren entre cada combinación de secuencias a pares para evaluar la saturación mutacional. El análisis de sitios conservados, variables e informativos fue realizado en MEGA (Tamura *et al.*, 2007).

#### **4.9 Diversidad Genética**

Los haplotipos fueron encontrados utilizando el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009). Los valores de diversidad genética (H) y nucleotídica (Pi) se obtuvieron mediante el software DNAsp. La distancia genética dentro y entre cada localidad fue calculada con el programa MEGA.

#### 4.10 Análisis Filogenético

Los análisis filogenéticos de los haplotipos encontrados se realizaron con varios métodos de construcción de árboles. El método de distancia *Neighbour Joining* (NJ) se realizó en el programa MEGA, incluyendo a las posiciones con transiciones y transversiones, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2 parámetros (K2P) (Kimura, 1980) y seleccionando la opción de eliminar los gaps en las comparaciones a pares. La evaluación de la topología encontrada se realizó mediante el análisis de *bootstrap* que consiste en un remuestreo aleatorio y con sustitución de las secuencias obtenidas, y permite obtener un nivel de confianza para las hipótesis presentadas (Felsenstein, 1985).

El análisis de Máxima Parsimonia (MP) se realizó en el programa PAUP\* (Swofford, 1998) considerando a los gaps como un quinto estado. La evaluación de la topología encontrada se realizó con un *bootstrap* de 1000 réplicas.

Para realizar el análisis de Máxima Verosimilitud (ML), se necesita primero de información sobre el modelo de sustitución nucleotídica de las secuencias, para ello se utilizó el programa Modeltest (Posada y Crandall, 1998, 2001) seleccionando el modelo adecuado según el criterio de información de Akaike (AIC) (Posada y Buckley, 2004). La selección del modelo se realizó *online* en el servidor del Modeltest ([http://darwin.uvigo.es/software/modeltest\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/modeltest_server.html)). Los datos del modelo son llevados hacia el PAUP\* para realizar la construcción filogenética. A pesar del esfuerzo computacional necesario para realizar un análisis de máxima verosimilitud, se pudo obtener un árbol consenso a partir de 1000 réplicas de *bootstrap*.

Utilizando los datos de Modeltest se seleccionó el modelo TVM (*transversion model*) (Rodríguez *et al.*, 1990) para el gen 16S rRNA, este modelo asume frecuencias diferentes de las bases nucleotídicas, así como tasas de transición iguales y tasas de transversión diferentes. Para el gen COI se utilizó el modelo GTR + I (Lanave *et al.*; 1984), GTR son las siglas de “*general time reversible*”, este modelo asume frecuencias diferentes de las bases nucleotídicas, y diferencias en las tasas de sustitución para cada par de bases, la letra I indica



que el programa asumirá la presencia de sitios invariantes dentro del alineamiento. En el caso de los marcadores concatenados el modelo utilizado fue el TVM + I, parecido al primer caso sólo que también asume la presencia de sitios invariantes en el alineamiento de secuencias.

La observación de los resultados se realizó mediante la opción *Tree Explorer* en MEGA, y utilizando el software TreeView (Page, 1996) para los árboles obtenidos con el PAUP\* (NJ, MP, ML).

El análisis bayesiano (BA) se realizó utilizando el programa Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) con los parámetros propuestos por el programa Mr. Modeltest (Nylander, 2004), evaluando las topologías mediante el algoritmo *Metropolis Coupled Monte Carlo Markov Chain* (MCMCMC), y usando 2 cadenas de Markov con 1 millón de generaciones cada una, cada generación representa una hipótesis de relaciones filogenéticas entre los organismos (i.e. árbol filogenético), a cada paso de la cadena el programa evalúa la topología del árbol construido, por ello no se necesita realizar un análisis de *bootstrap*. Se eliminaron los primeros 2500 árboles muestreados (*burning*), debido a que poseían bajos valores de probabilidad. El consenso de los árboles restantes también se observó con la aplicación TreeView.

Los análisis se realizaron para cada marcador (16S rRNA y COI) por separado, y también se concatenaron las secuencias siguiendo el orden del genoma del molusco *Albinaria coerulea* (Gastropoda, Clausiliidae) (accesión de Genbank: NC\_001761).

#### **4.11 Redes de haplotipos (*Networks*)**

El análisis de filogenia intraespecífica utilizando "*networks*" o redes de haplotipos fue realizado con el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999) con el algoritmo "*median joining*" sólo para las secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA obtenidas en *S. helicycloides*.

#### 4.12 Análisis de estructura poblacional

En el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005) se realizó la evaluación de diferenciación poblacional y flujo génico mediante el cálculo del estadístico  $\phi_{st}$ , análogo al índice de fijación  $F_{st}$  (Wright, 1965), el análisis se realizó con las secuencias del gen 16S rRNA. El rango de este parámetro oscila entre 0 y 1, correspondiendo 0 a la ausencia de estructuración poblacional (principalmente debido a eventos de flujo génico) y 1 la presencia de una fuerte estructura poblacional (debido a la ausencia de flujo génico),

#### 4.13 Patrones demográficos

Se calcularon los estadísticos promedio de diferencias a pares ( $k$ ), número de sitios polimórficos ( $s$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) con el DNAsp. Estos valores permiten tener una idea de la diversidad genética en las secuencias, así como de los parámetros de crecimiento poblacional.

Para evaluar si existió una expansión demográfica súbita en las poblaciones se calculó la distribución de diferencias a pares de las secuencias (*mismatch distribution*) (Rogers y Harpending, 1992), las gráficas de esta distribución fueron obtenidas en DNAsp. El valor máximo de la distribución es conocido como tau ( $\tau$ ), siendo que  $\tau = 2ut$ , donde  $u$  representa la tasa de mutación (ver siguiente sección) y  $t$  es el tiempo desde la expansión.

Además se utilizó el test de neutralidad  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). La significancia estadística del  $F_s$  de Fu fue evaluada por una simulación de coalescencia con 1000 permutaciones.

#### 4.14 Tiempos de Divergencia

La estimación de los tiempos de divergencia se realizó en el programa MEGA a partir de un árbol NJ previamente linearizado (Takezaki *et al.*, 1995) y con el supuesto del reloj molecular (una tasa de mutación estable entre las secuencias). Dado que no se conoce la tasa de mutación para el genoma

mitocondrial de *Systrophia helycicloides*, se estimó una tasa de divergencia intermedia para moluscos terrestres (Chiba, 1999; Pfenninger y Posada, 2002; Pfenninger *et al.* 2003; Ramírez, 2004) de 0,06 sustituciones por sitio por millón de años.

En este análisis se relaciona la tasa de sustitución con la divergencia entre las secuencias, una mayor diferencia entre las secuencias implica un mayor número de mutaciones acumuladas y una divergencia más antigua.

Por otro lado, se utilizó el programa BEAST (Drummond y Rambaut, 2007) para realizar la estimativa tanto de la divergencia entre las secuencias, como el tiempo de coalescencia al ancestro común más reciente (TMRCA). El BEAST se basa en análisis bayesiano y permite la estimación de resultados dentro de límites de confianza.

Finalmente, y aprovechando la misma ventaja del análisis bayesiano se utilizó el programa MDIV (Nielsen y Wakeley, 2001). Este programa utiliza el algoritmo MCMCMC (*Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo*) para estimar tres parámetros: (1)  $\theta=2N_eu$ , (2)  $M=2N_em$ , (3)  $T=t/2N_e$ .  $N_e$  es el tamaño efectivo de la población (total de individuos con capacidad de reproducirse, para el caso del DNA mitocondrial sólo se considera la línea matrilineal);  $m$  es la tasa de migración;  $u$  es la tasa de mutación por generación por unidad de tiempo que para nuestro caso se estimó de la siguiente manera: Tasa de mutación por millón de años (0,06) dividida entre un millón de años, este resultado se multiplicó por el tamaño del alineamiento (entre 300 pb aprox.) y por el tiempo generacional, el cual ha sido estimado en al menos dos años para moluscos terrestres (Goodacre, 2001; Schilthuizen *et al.*, 2005), así resultó  $u=3,66 \times 10^{-5}$ ; este dato y el parámetro (1) ayudan a estimar  $t$  (tiempo de divergencia) (Batalha-Filho, 2008). El MDIV fue utilizado también para generar una curva de probabilidad de divergencia entre los grupos encontrados para *S. helycicloides*. El valor de divergencia ( $t$ ) que corresponde al punto más alto de la curva generada y  $N_e$  obtenido a partir de la fórmula (1) pueden ser luego reemplazados en la fórmula (3) para obtener el tiempo de divergencia en años.

#### 4.15 *Barcoding*

Para realizar el análisis de código de barras de DNA utilizando el marcador COI se debe tener en cuenta que los perfiles COI (1) deben ser únicos para cada especie (no repetirse entre especies diferentes), (2) los haplotipos de la especie deben resultar en una monofilia (deben pertenecer a un mismo clado/grupo) y (3) tener una distancia genética intraespecífica menor al 2% (Hebert *et al.*, 2004).

Luego de conocer que las secuencias obtenidas representan al COI (utilizando BLAST), éstas son ingresadas al *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (<http://www.barcodinglife.org/>). Se debe introducir al menos tres secuencias por especie. Además, es indispensable contar con los datos de la especie, localidad de procedencia, lugar de conservación (instituto, universidad, museo, etc.), institución que realiza la investigación, fragmentos de COI mayores a 500 pb y verificar que los *primers* utilizados estén aprobados por esta base de datos (Ratnasingham y Hebert, 2007). Las secuencias fueron comparadas con cuatro tipos de bases de datos en el BOLD:

*All Barcode Database*: Todas las secuencias COI del BOLD con un tamaño mínimo de 500 bp. Este grupo contiene especies representadas por sólo uno o dos especímenes o con problemas taxonómicos.

*COI Public Records*: Secuencias COI de BOLD y *Genbank* con un tamaño mínimo de 500 bp. Estas secuencias se encuentran la sección Published Projects en el BOLD.

*COI Species Level*: Secuencias COI con un tamaño mínimo de 500 bp y que poseen un identificador de especie, aunque estas especies pueden estar representadas sólo por uno o dos especímenes o pueden tener problemas de identificación.

*COI Full lenght*: Un subgrupo de la base de datos a nivel de especie con un tamaño mínimo de 640 bp. Este subgrupo está compuesto de secuencias de registros públicos y privados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis del marcador mitocondrial 16S rRNA

#### 5.1.1 Descripción de las secuencias obtenidas

Se obtuvieron secuencias de 46 individuos de *Systrophia helicycloides*, 11 de CICRA, 7 de CM1, 10 de Concepción, 8 de Palmereto y 10 de Gamitana, a este conjunto de datos se le agregaron tres secuencia: *Systrophia eatoni*, *Systrophia stenostrepta* y *Wayampia* sp., completando en total 49 secuencias.

La frecuencia de bases es similar entre todos los individuos de *S. helicycloides* estudiados (Tabla 3), observándose similitud entre las localidades de CICRA – CM1 y Gamitana – Concepción. Existe mayor cantidad de AT ( $\approx 70\%$ ) con respecto a GC ( $\approx 30\%$ ).

**Tabla 3.** Frecuencia de bases de las secuencias obtenidas del marcador mitocondrial 16S rRNA. T=Timina, C=Citosina, A=Adenina, G=Guanina, Long.=Longitud, N= Número de secuencias

	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>Long</b>	<b>N</b>
<b>CICRA</b>	32,2	12,5	35,8	19,5	305,2	11
<b>CM1</b>	32,3	12,5	35,7	19,6	305,0	7
<b>Concepción</b>	31,9	12,7	36,0	19,4	305,0	10
<b>Palmereto</b>	32,8	11,7	35,6	19,9	305,0	8
<b>Gamitana</b>	31,8	12,8	36,0	19,4	305,0	10
<b>Promedio</b>	32,2	12,4	35,8	19,6	305,0	

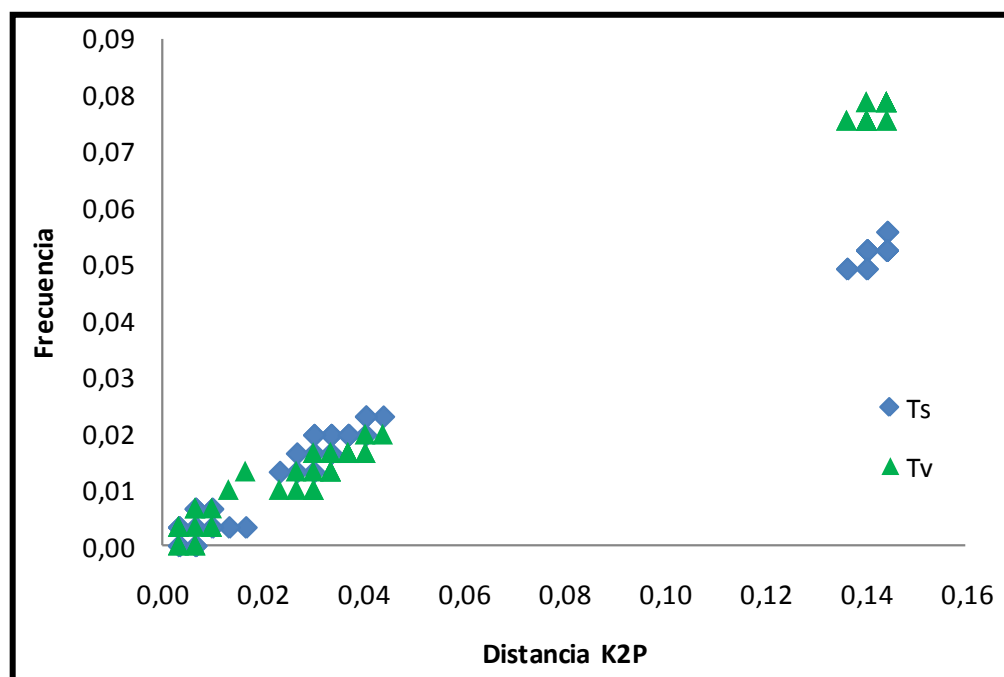
El análisis de comparación de secuencias utilizando la herramienta BLASTN del NCBI se muestra en la Tabla 4. Se verificó en todos los casos que el gen amplificado fue el 16S rRNA. Todas las secuencias de *Systrophia helicycloides* resultaron similares a miembros de la familia de moluscos de agua dulce Planorbidae (*Anisus vortex*, *Planorbis planorbis*, *Gyraulus parvus*, *Biomphalaria* cf. *choanomphala*). Los valores de identidad varían entre 77% y 78%.

**Tabla 4.** Resultados de comparación de las secuencias 16S rRNA obtenidas con la herramienta BLASTn. Los códigos de las secuencias de *S. helicycloides* corresponden a las siguientes localidades Con=Concepción, Gam=Gamitana, Clo/Cic= CICRA, Mad/Puv=CM1, Pal=Palmereto. SysC, SysR y Way corresponden a *S. stenostrepta*, *S. eatoni* y *Wayampia* sp.

Individuo	Mejor hit en BLASTn	Familia	Gen	# Accesión	Valor E	% Identidad
CicP656	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	3,0E-39	77
CicP667	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-37	77
CicP699	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
CicP703	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
CloP20a	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	6,0E-41	78
CloP21b	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
CloP93a	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
CloP47b	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
CloP95b	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
CloP96a	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
CloP97c	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
MadK15a	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
MadK16b	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
MadK17e	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
MadK18c	<i>Gyraulus parvus</i>	Planorbidae	16S rRNA	EU038347.1	2,0E-36	77
MadP55d	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
PuvK14b	<i>Biomphalaria cf. choanomphala</i>	Planorbidae	16S rRNA	EU141184.1	3,0E-38	77
PuvP54d	<i>Biomphalaria cf. choanomphala</i>	Planorbidae	16S rRNA	EU141184.1	3,0E-38	77
ConK11g	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConK21a	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConK22p	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConK24g	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConK30l	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConK36f	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConP33b	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConP61m	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
ConP98c	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
ConP99i	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamK12h	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamK13i	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
GamK20j	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamK28l	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamP100e	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamP50d	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamP52a	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamP53b	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamP91k	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
GamP92n	<i>Anisus vortex</i>	Planorbidae	16S rRNA	AY577478.1	1,0E-38	77
PalK31i	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
PalP23b	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
PalP29g	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
PalP46a	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
PalP48c	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
PalP49d	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	1,0E-37	77
PalP90j	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	6,0E-41	78
TrAK231	<i>Planorbis planorbis</i>	Planorbidae	16S rRNA	EF489315.1	3,0E-39	77
SysRP37	<i>Praticolella griseola</i>	Polygyridae	16S rRNA	DQ086019.1	2,0E-35	77
SysCsP42	<i>Everettia planispira</i>	Ariophantidae	16S rRNA	FJ160595.1	1,0E-33	76
WaysP43	<i>Satsuma sp.</i>	Camaenidae	16S rRNA	EF204785.1	2,0E-30	81

Las secuencias de *Systrophia eatoni* y *Systrophia stenostrepta* se asemejaron a *Praticolella griseola* (Polygyridae) y *Everettia planispira* (Ariophantidae) respectivamente. Estas familias agrupan especies de moluscos terrestres. La secuencia de *Wayampia* es similar a la de *Satsuma* sp., perteneciente a la familia de moluscos terrestres Camaenidae.

En el programa DAMBE se evaluó el grado de saturación de las mutaciones encontradas. Las transiciones y transversiones tienen una distribución similar dentro de las secuencias y aún no presentan un grado evidente de saturación (Fig. 6). Se observa además la presencia de al menos dos grupos de secuencias, diferenciados por una considerable cantidad de transiciones y transversiones.

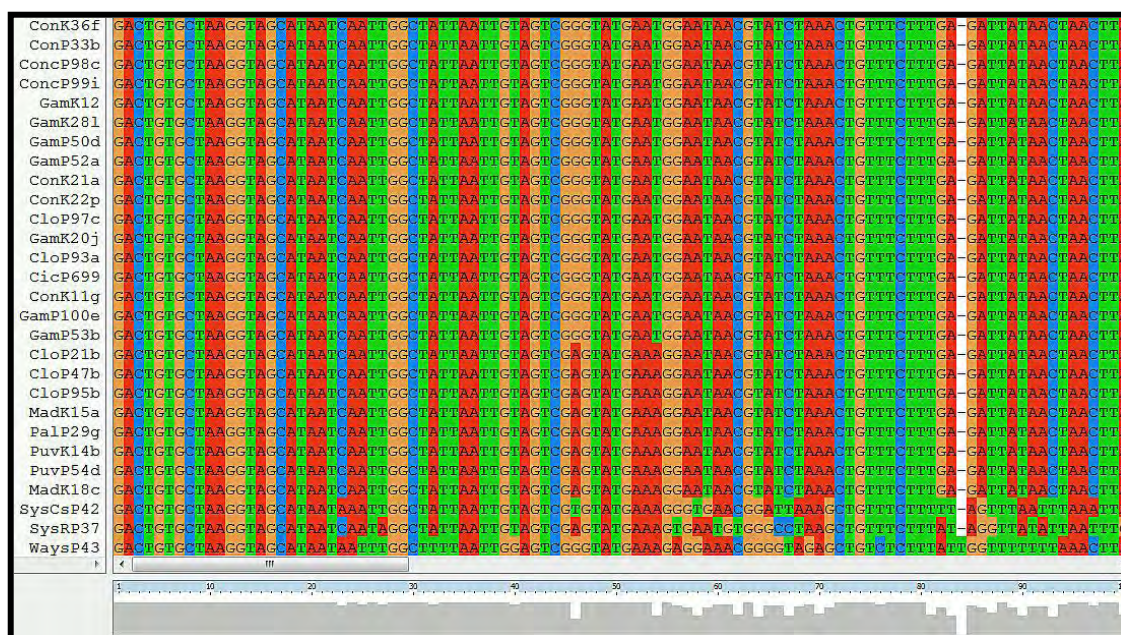


**Figura 6.** Transiciones y tranversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias 16S rRNA de *S. helicycloides*. Ts=Transiciones (rombos), Tv=Transversiones (triángulos). El modelo de distancia utilizado fue el de Kimura 2-Parámetros (Kimura, 1980).

### 5.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias

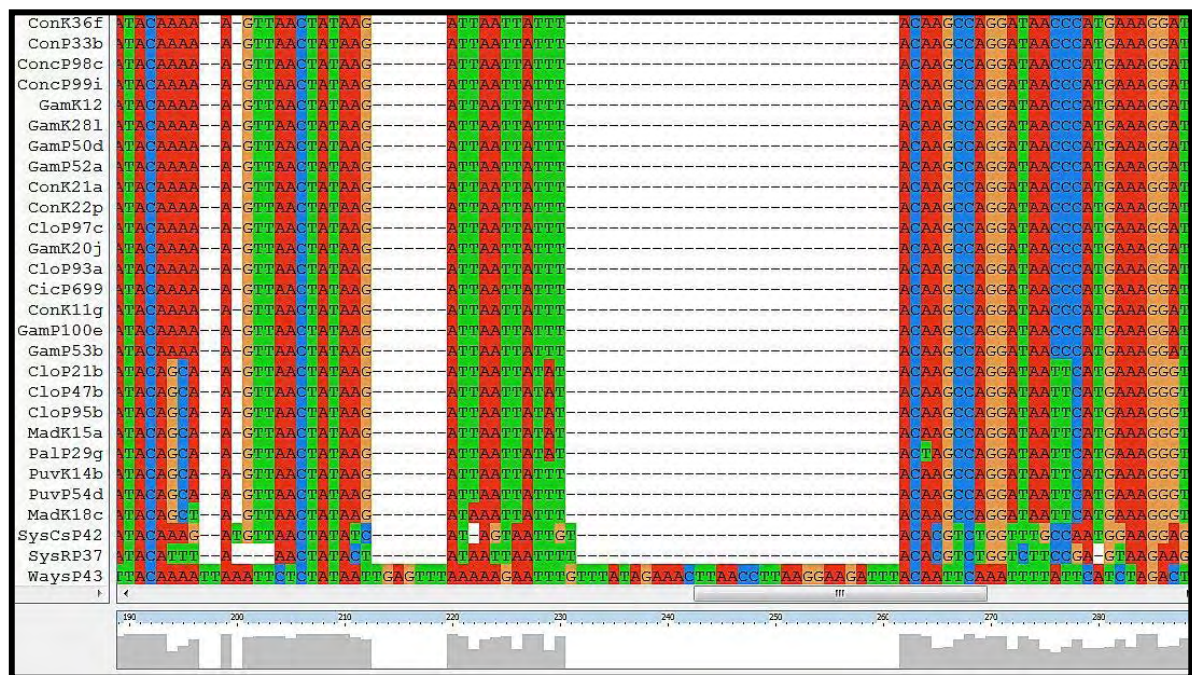
El alineamiento múltiple de las secuencias del 16S rRNA resultó en 353 sitios alineados, observándose la presencia de “*indels*” (eventos de inserción/delección). El alineamiento presentó 190 sitios conservados, 119 posiciones variables y 69 sitios informativos.

La primera zona conservada corresponde al sitio de hibridación del primer 16SF-104. El primer *indel* es generado por la secuencia de *Wayampia*, la primera porción del alineamiento es conservada, observándose mutaciones puntuales y pocos *indels* (Fig. 7). La porción central del alineamiento presenta una gran zona de *gaps*, evidenciando el polimorfismo de longitud en la secuencia de *Wayampia* sp. (Fig. 8). El último segmento del alineamiento corresponde al sitio de hibridación del primer 16SR-472 (Fig. 9).

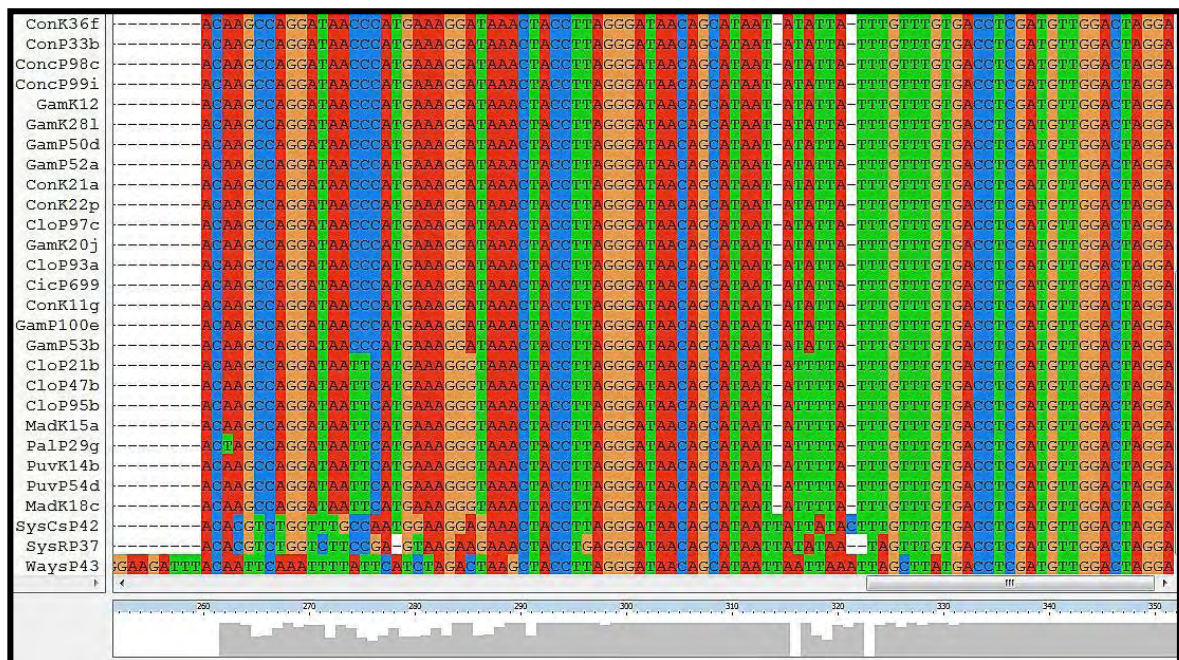


**Figura 7.** Primera porción del alineamiento múltiple de secuencias del gen 16S rRNA. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX 2.0. Los códigos de las secuencias de *S. helicycloides* corresponden a las siguientes localidades Con=Concepción, Gam=Gamitana, Clo/Cic= CICRA, Mad/Puv=CM1, Pal=Palmereto. SysC, SysR y Way corresponden a *S. stenostrepta*, *S. eatoni* y *Wayampia* sp. El primer *gap* es generado por la secuencia de *Wayampia* sp.





**Figura 8.** Porción central del alineamiento múltiple de secuencias del gen 16S rRNA. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX 2.0. Los códigos de las secuencias de *S. helicycloides* corresponden a las siguientes localidades Con=Concepción, Gam=Gamitana, Clo/Cic= CICRA, Mad/Puv=CM1, Pal=Palmereto. SysC, SysR y Way corresponden a *S. stenostrepta*, *S. eatoni* y *Wayampia* sp. Obsérvese la gran región de gaps provocada por la secuencia de *Wayampia*.



**Figura 9.** Porción final del alineamiento múltiple de secuencias del gen 16S rRNA. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX 2.0. Los códigos de las secuencias de *S. helicycloides* corresponden a las siguientes localidades Con=Concepción, Gam=Gamitana, Clo/Cic= CICRA, Mad/Puv=CM1, Pal=Palmereto. SysC, SysR y Way corresponden a *S. stenostrepta*, *S. eatoni* y *Wayampia* sp.

Al observar los sitios polimórficos informativos encontramos que existe un grupo de secuencias que presenta una gran cantidad de mutaciones (más de 35) con respecto a las demás (secuencias pertenecientes a los haplotipos S10 y S11 – ver siguiente sección). Existe otro grupo de secuencias que agrupa principalmente a individuos de las localidades de Los Amigos. Cabe mencionar, la presencia de una secuencia bastante frecuente dentro de la población (Tabla 5). Este resultado demuestra una gran variabilidad del marcador mitocondrial 16S rRNA entre los individuos de *S. helicycloides*.

**Tabla 5.** Sitios polimórficos informativos observados en el alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA. Hap=Haplotipo. Los códigos de los individuos de *S. helicycloides* corresponden a las localidades: Cic/Clo (CICRA), Mad/Puv (CM1), Gam(Gamitana), Con (Concepción), Pal (Palmereto). SysC, SysR y Way representan a las secuencias de *S. stenostrepta*, *S. eatoni* y *Wayampia* sp.

[illegible]

### 5.1.3 Diversidad Genética

Para el análisis poblacional se excluyeron las secuencias de *Systrophia stenostrepta*, *Systrophia eatoni* y *Wayampia* sp. El nuevo alineamiento de 46 secuencias del gen 16S rRNA sólo de *Systrophia helicycloides* resultó en 306 sitios alineados, de los cuales 257 son sitios conservados, 49 son posiciones variables y 45, informativos.

Se encontraron 11 haplotipos para las 46 secuencias estudiadas, la diversidad genética fue de 0,807, y el valor Pi de la diversidad nucleotídica fue de 0,04569. Se observó la presencia de haplotipos altamente divergentes como S10 y S11 (Tabla 7). Al observar la distribución, se encuentra que la mayoría de haplotipos tiene distribución restringida a una localidad o zona estudiada; sin embargo, los haplotipos más frecuentes se localizan en ambas zonas estudiadas, tal es el caso de S5 (18 individuos) presente en CICRA, Concepción y Gamitana, o S1 (7 individuos) presente en CICRA, CM1, Gamitana y Palmereto (Tabla 6).

**Tabla 6.** Distribución de los haplotipos 16S rRNA de *S. helicycloides* en las localidades muestreadas

Regiones	Localidades	Haplotipos											Total
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	
Los Amigos	CICRA	2	1	1		3	3				1		11
	CM1	3					1		2	1			7
Bajo Madre de Dios	Concepción				1	8						1	10
	Gamitana	1			2	7							10
	Palmereto	1						1			1	5	8
Total		7	1	1	3	18	4	1	2	1	2	6	46

Las distancias genéticas entre las localidades estudiadas varían de 1,5 -11,4%. La divergencia en promedio es de 2 a 3%. Las mayores distancias genéticas se encontraron al comparar las localidades contra la localidad de Palmereto. Entre las secuencias de Palmereto también existe una gran variación entre las secuencias (distancia= 5,7%) (Tabla 8).

**Ta**bla 7. Haplotipos de *Systrophia helicycloides* encontrados en el análisis de las secuencias del marcador mitocondrial 16S rRNA. Hap=Haplotipo, Pob=Población, N=Tamaño muestral. Cuenca del Río Los Amigos: Centro de Monitoreo 1 (CM1) y CICRA (Cic), cuenca del Bajo Madre de Dios: Gamitana (Gam), Palmereto (Pal) y Concepción (Con)

Hap	1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2																																							
-----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

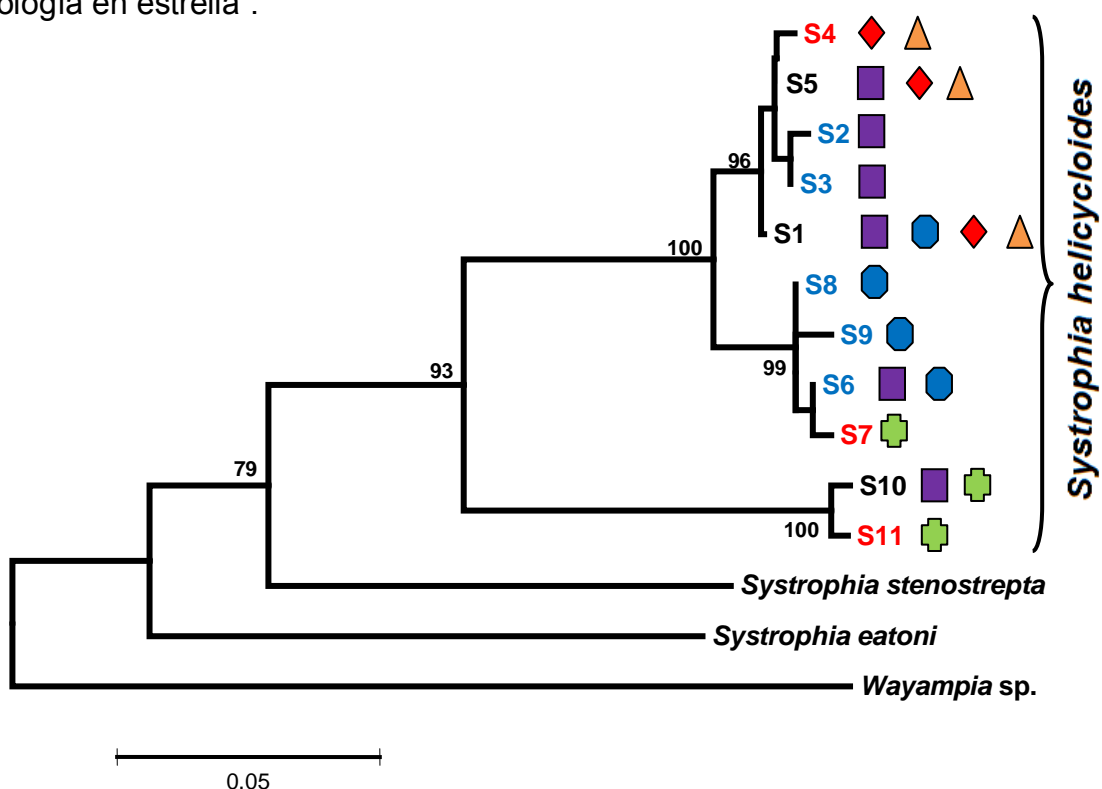
**Tabla 8.** Distancias genéticas para el marcador 16S rRNA entre y dentro de las localidades muestreadas

	CICRA	CM1	Concepción	Gamitana	Palmereto
<b>CICRA</b>	0,039				
<b>CM1</b>	0,029	0,017			
<b>Concepción</b>	0,033	0,031	0,029		
<b>Gamitana</b>	0,023	0,019	0,015	0,020	
<b>Palmereto</b>	0,106	0,112	0,106	0,114	0,057

#### 5.1.4 Análisis Filogenético

El análisis NJ que elabora un árbol a partir de las distancias genéticas encontradas en el gen 16S rRNA produjo el siguiente resultado (Fig. 10): Las secuencias de *Wayampia*, *S. stenostrepta* y *S. eatoni* quedan diferenciadas del grupo de secuencias de *S. helicycloides*, el cual como grupo se encuentra altamente sustentado (*bootstrap*=93%). Dentro de este grupo podemos encontrar dos agrupaciones bien definidas, un clado con los haplotipos S10 y S11, y el otro clado con el resto de haplotipos. Dentro de este segundo clado encontramos otros dos grupos de haplotipos (S1-S5, y S6-S9), además sólo en el grupo S1-S5 se encuentran haplotipos ampliamente distribuidos.

La presencia de varios haplotipos con poca diferencia entre sí, y su aparición hacia el final de las ramas da al árbol una forma conocida como “topología en estrella”.

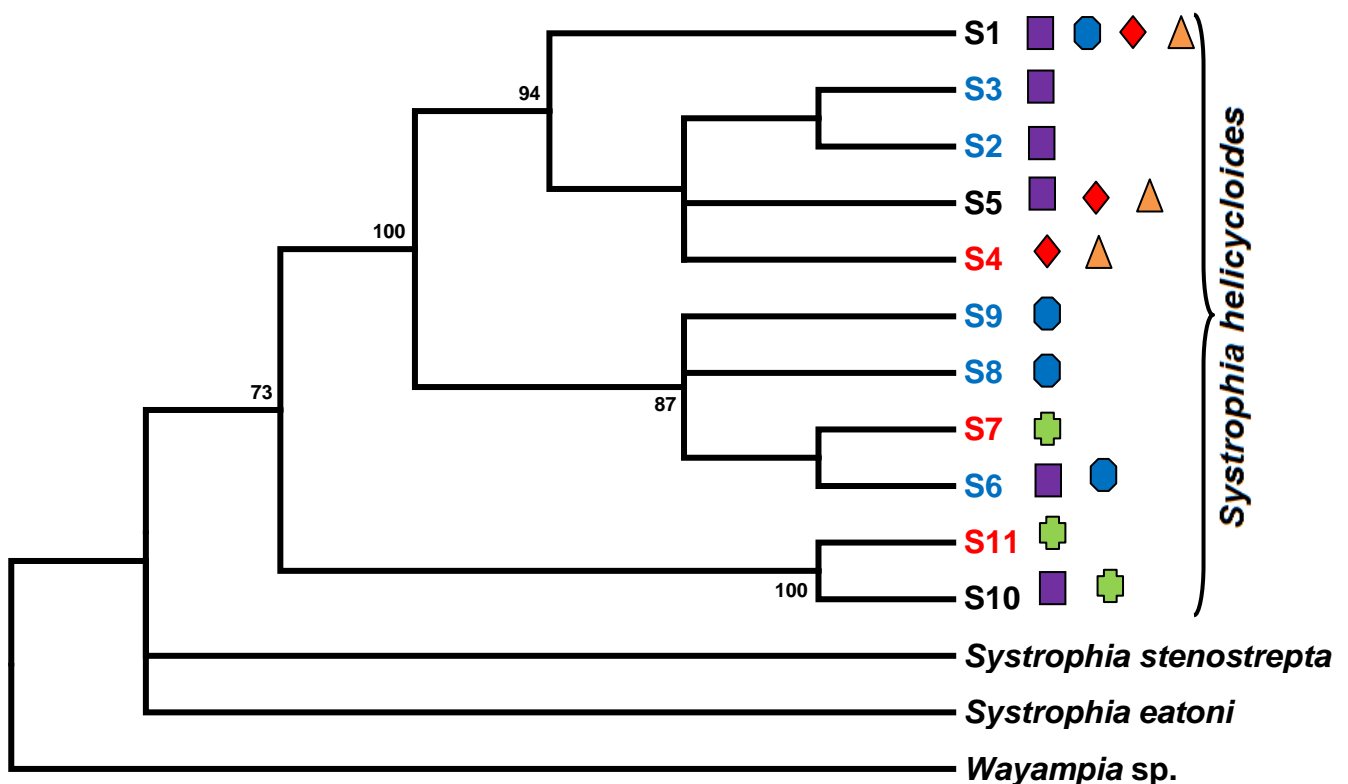


**Figura 10.** Filogenia NJ de los haplotipos 16S rRNA de *S. helicycloides*. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), CM1 (octágono), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%. La escala representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.



El análisis de máxima parsimonia (MP, Fig. 11) nos muestra resultados similares, *Wayampia* como grupo externo así como gran diferenciación con las otras especies de *Systrophia*. Dentro de nuestra especie en estudio, vemos la presencia del clado S10-S11, y de los grupos internos S1-S5 y S6-S9, todos soportados con altos índices de *bootstrap*. En el árbol se observa también que existen clados no resueltos produciendo una politomía, tal es el caso de S5-S4, S8-S9, *S. stenostrepta* y *S. eatoni*. El análisis de parsimonia no resolvió todas las relaciones entre los haplotipos utilizados.

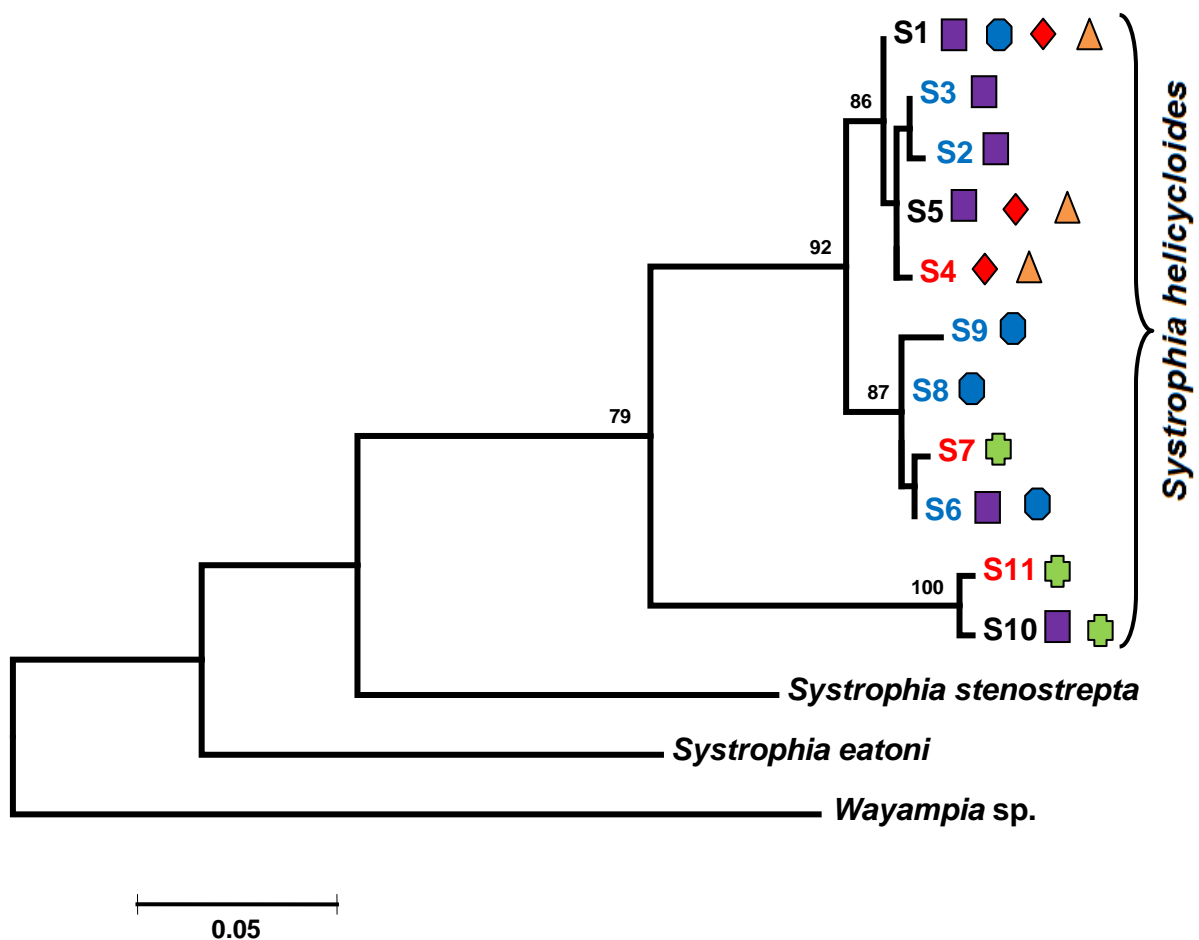
Los valores de *bootstrap* son también más bajos que en el caso del análisis de distancia. La falta de resolución en este análisis puede venir de la dificultad de generar grupos de secuencias a partir de los sitios informativos encontrados.



**Figura 11.** Filogenia MP de los haplotipos 16S rRNA. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), CM1 (octágono), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterro de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%.

En el análisis de máxima verosimilitud (ML, Fig. 12) se observó la presencia de tres grupos de secuencias dentro de *S. helicycloides*. Los valores de soporte de los clados son menores comparados con el análisis de NJ.

Tal como en los árboles anteriores, se observa que los haplotipos no se agrupan según la zona de donde provienen, es decir no existe la presencia de un clado sólo con haplotipos de Los Amigos o Inkaterrea.



**Figura 12.** Filogenia ML de los haplotipos 16S rRNA. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), CM1 (octágono), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterrea de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%. La escala representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

**Figura 13.** Relaciones filogenéticas entre los haplotipos 16S rRNA de *S. helicycloides* reconstruidas a partir de inferencia bayesiana. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), CM1 (octágono), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Los valores numéricos indican la probabilidad posterior de los clados que poseían la mayor probabilidad. La escala representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.



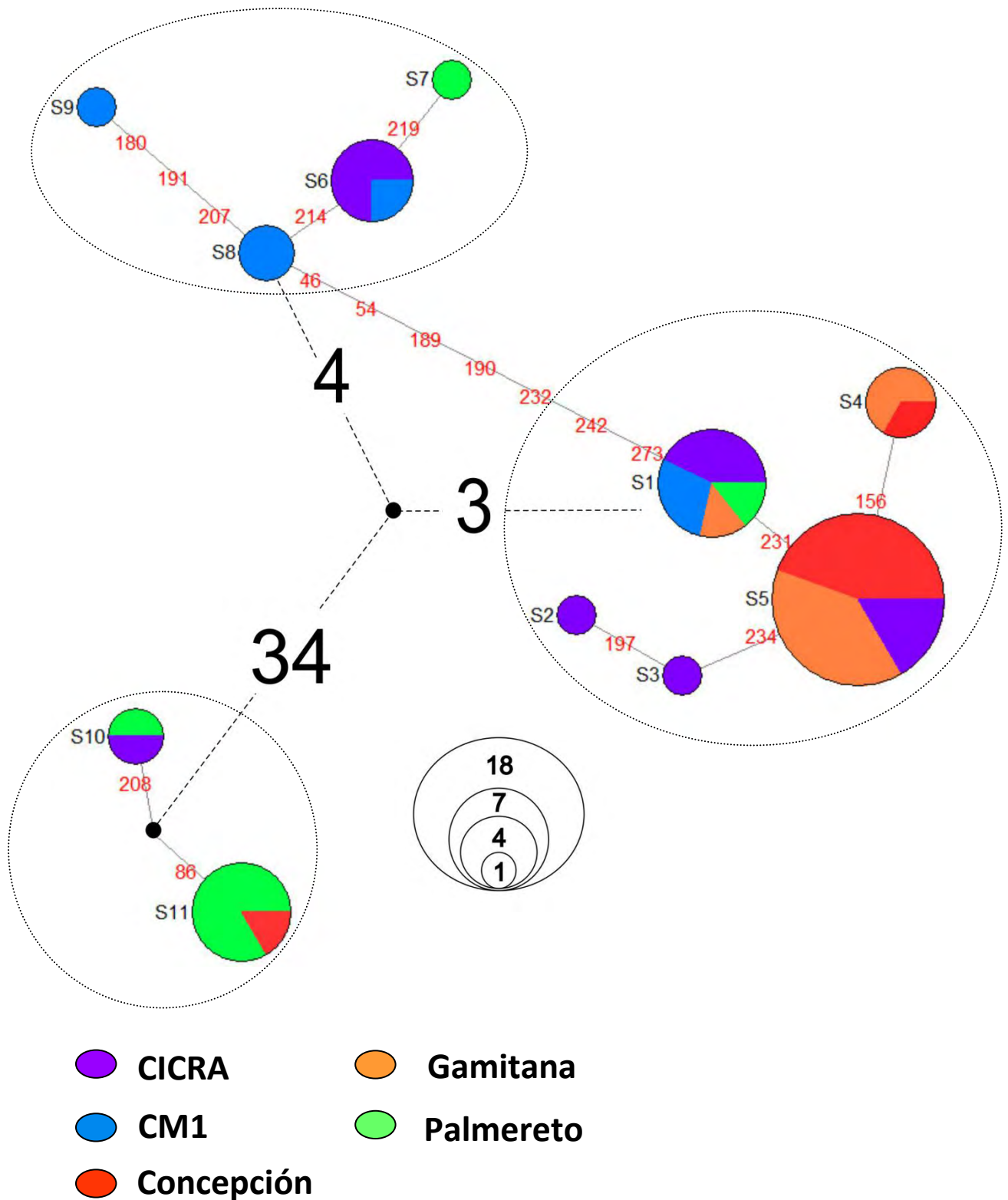
### 5.1.5 Redes de haplotipos (*Networks*)

Existe otra manera de encontrar las relaciones filogenéticas entre todos los individuos en estudio, utilizando el método de redes de haplotipos (Bandelt *et al.*, 1999) donde se generan árboles no enraizados para observar las relaciones entre los haplotipos (secuencias diferentes) y sus frecuencias. Este análisis permite observar visualmente patrones demográficos y de flujo génico. Al no necesitar árboles enraizados se prescindió de los individuos usados como grupos externos.

La red de haplotipos del 16S rRNA de *S. helicycloides* nos muestra las diferencias entre los grupos de secuencias encontrados (Fig. 14). En el primer grupo (S1-S5) tenemos a los haplotipos con mayor frecuencia (S1=7, S5=18). El haplotipo S5 se encuentra distribuido tanto en la zona de Los Amigos como en Inkaterra. Las diferencias entre este grupo de haplotipos son pequeñas (4 mutaciones), este grupo corresponde a más del 50% de los individuos muestreados (Tabla 6).

El segundo grupo consiste en los haplotipos S6-S9, la mayoría de ellos de la región de Los Amigos, salvo S7; el número máximo de diferencias entre los haplotipos es 5 mutaciones, este grupo representa menos del 20% de individuos muestreados.

Finalmente, los haplotipos S10 y S11, se encuentran muy distanciados (a 37 y 38 mutaciones) de los otros grupos mencionados. La presencia de mutaciones que separan estos haplotipos de los demás pudo ser observada desde el alineamiento múltiple de secuencias. Estos individuos se encuentran en su mayoría en la zona de Palmereto (Inkaterra).



**Figura 14.** Red de haplotipos para el marcador mitocondrial 16S rRNA. Los números en rojo representan las posiciones mutadas en el alineamiento. Los números sobre las líneas punteadas representan el número de mutaciones. Los puntos negros indican la presencia de haplotipos no muestreados o extintos. La escala representa el número de haplotipos. Obsérvese la presencia de tres grupos diferentes de haplotipos.

### 5.1.6 Estructura y diferenciación poblacional

El estadístico  $\phi_{st}$  (análogo al  $F_{st}$ ) se utilizó para encontrar diferenciación genética entre las poblaciones, la diferenciación indica restricción de flujo génico entre las poblaciones. Valores cercanos a 1 indican una mayor diferenciación entre las poblaciones mientras que valores cercanos a 0 indican poblaciones más homogéneas.

Al realizar un análisis comparando entre localidades (Tabla 9) observamos la existencia de altos valores de diferenciación (mayores al valor límite 0,2), sin embargo no se observa diferenciación significativa entre las localidades de CM1 y CICRA. CM1 presenta una mayor diferenciación con las localidades de Inkaterra que CICRA. Dentro de la zona de Inkaterra tampoco existe diferenciación significativa entre Gamitana y Concepción (localidades que están separadas por el río Madre de Dios, Fig. 4). Todas las localidades quedaron significativamente diferenciadas de Palmereto.

**Tabla 9.** Valores de  $\phi_{st}$  entre las localidades muestreadas. Un valor cercano a 1 indica gran diferenciación entre las poblaciones. Los números en rojo son resultados no significativos

	CM1	CICRA	Concepción	Gamitana	Palmereto
CM1	0,00000				
CICRA	0,00895	0,00000			
Concepción	0,25515	-0,00540	0,00000		
Gamitana	0,55046	0,11558	-0,00891	0,00000	
Palmereto	0,61664	0,51393	0,57059	0,73502	0,00000

Sin embargo, cuando prescindimos de los haplotipos altamente divergentes S10 y S11, los resultados varían considerablemente (Tabla 10). En este caso sólo Gamitana es significativamente diferenciada de Palmereto (0,66), y la localidad CICRA ya no queda diferenciada de Concepción (0,07) pero sí de Gamitana (0,20). Por otro lado, CM1 sigue siendo diferente de Concepción (0,26) y Gamitana (0,55).

**Tabla 10.** Valores de  $\phi_{st}$  entre las localidades muestreadas, sin considerar a los haplotipos altamente divergentes S10 y S11. Un valor cercano a 1 indica gran diferenciación entre las poblaciones. Los números en rojo son resultados no significativos

	CM1	CICRA	Concepción	Gamitana	Palmereto
<b>CM1</b>	0,00000				
<b>CICRA</b>	0,05701	0,00000			
<b>Concepción</b>	0,25515	0,06648	0,00000		
<b>Gamitana</b>	0,55046	0,20062	-0,00891	0,00000	
<b>Palmereto</b>	-0,31250	-0,15864	0,07640	0,65686	0,00000

Comparando entre las regiones observamos que las diferencias no son muy altas (0,097, Tabla 11a), sin embargo al no utilizar los haplotipos divergentes esta diferenciación se hace algo mayor (0,167, Tabla 11b). Aún así, ésta no alcanza el valor límite de 0,2, indicando la presencia de una alta frecuencia de haplotipos compartidos entre las localidades.

**Tabla 11.** Valores de  $\phi_{st}$  entre las regiones estudiadas, Los Amigos (CM1/CICRA) o Bajo Madre de Dios (Con/Gam/Pal). Un valor cercano a 1 indica gran diferenciación entre las poblaciones. (a) Valores encontrados utilizando todos los haplotipos, y (b) sin utilizar a los haplotipos altamente divergentes S10 y S11

	(a)		(b)	
	CM1-CICRA	Con-Gam-Pal	CM1-CICRA	Con-Gam-Pal
<b>CM1-CICRA</b>	0,00000		0,00000	
<b>Con-Gam-Pal</b>	0,09735	0,00000	0,16699	0,00000

Si queremos demostrar la influencia de los ríos como barreras geográficas a la dispersión del molusco, observemos el valor de  $\phi_{st}$  entre CM1 y CICRA (Tabla 9, 10), este valor es cercano a 0 lo que indica una homogenización de las poblaciones a ambos lados del río Los Amigos. Por otro lado, la diferenciación entre Gamitana y Concepción también es mínima (valores de diferenciación no significativa, Tabla 9, 10).

### 5.1.7 Patrones Demográficos

El análisis de la filogenia intraespecífica y la red de haplotipos indican la posibilidad de eventos de expansión súbita en algunas poblaciones de *S. helicycloides*, la presencia de la topología en estrella sugiere un episodio de cuello de botella genético seguido de expansión poblacional súbita. Para demostrar esta hipótesis se calcularon los valores de diferencias a pares ( $k$ ), número de sitios segregantes o polimórficos ( $s$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) que se muestran en la Tabla 12. Estos valores pueden indicar la "firma" que deja en la estructura genética de las poblaciones los episodios de cuello de botella genético seguido de expansión poblacional. Además, se realizó el análisis de *mismatch distribution* (distribución de diferencias a pares entre las secuencias) para observar gráficamente la ocurrencia de este evento.

En la Tabla 12 observamos la relación directa que tienen los valores de número promedio de diferencias a pares ( $k$ ), sitios polimórficos ( $s$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). Una mayor diversidad es expresada en mayores valores para cada uno de los estadísticos utilizados.

Si analizamos las secuencias agrupándolas según los tres principales grupos encontrados (aquí llamados linajes) los valores de diversidad haplotípica son medios (Tabla 12a), los bajos valores de los otros estadísticos de diversidad en este caso implican la mayor similitud que existe entre las secuencias dentro de cada linaje. Si agrupamos a las secuencias por localidad, encontramos mayores valores en los estadísticos de diversidad provocados principalmente por la presencia de haplotipos altamente divergentes dentro de las poblaciones (ej. CICRA, Concepción, Palmereto, Tabla 12b). Si quitamos estas secuencias divergentes correspondientes al linaje 3 (Tabla 12c) los valores más altos de diversidad se encuentran en la región de Los Amigos (CICRA y CM1, Tabla 12c) en comparación con Inkaterra; el valor de  $H=1,000$  para Palmereto es una sobreestimación de la diversidad genética debido a que sólo se evaluaron dos secuencias en este caso. En general la diversidad es relativamente alta y se debería al elevado número de sitios polimórficos al comparar las secuencias.

**Tabla 12.** Valores del promedio de diferencias a pares (k), número de sitios polimórficos (s) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) del gen 16S rRNA para (a) los linajes encontrados, (b) las poblaciones de *S. helicycloides*, y (c) las localidades sin considerar a los haplotipos altamente divergentes S10 y S11. Se añadieron los datos de número de haplotipos y diversidad genética (H) con fines de comparación

		Número de secuencias	Número de Haplotipos	H	k	s	$\pi$
(a)	<b>Linaje 1</b>	30	5	0,593	0,752	4	0,00246
	<b>Linaje 2</b>	8	4	0,750	1,536	5	0,00504
	<b>Linaje 3</b>	8	2	0,429	0,857	2	0,00281
(b)	<b>CICRA</b>	11	6	0,873	11,036	44	0,03618
	<b>CM1</b>	7	4	0,810	5,143	11	0,01686
	<b>Concepción</b>	10	3	0,378	8,000	40	0,02623
	<b>Gamitana</b>	10	3	0,511	0,556	2	0,00182
	<b>Palmereto</b>	8	4	0,643	17,393	44	0,05703
(c)	<b>CICRA</b>	10	5	0,844	4,844	11	0,01588
	<b>CM1</b>	7	4	0,810	5,143	11	0,01686
	<b>Concepción</b>	9	2	0,222	0,222	1	0,00073
	<b>Gamitana</b>	10	3	0,511	0,556	2	0,00182
	<b>Palmereto</b>	2	2	1,000	9,000	9	0,02951
<b>Total (*)</b>		46	11	0,807	13,936	49	0,04569

(\*) Los valores totales fueron hallados usando el conjunto completo de secuencias de *S. helicycloides*

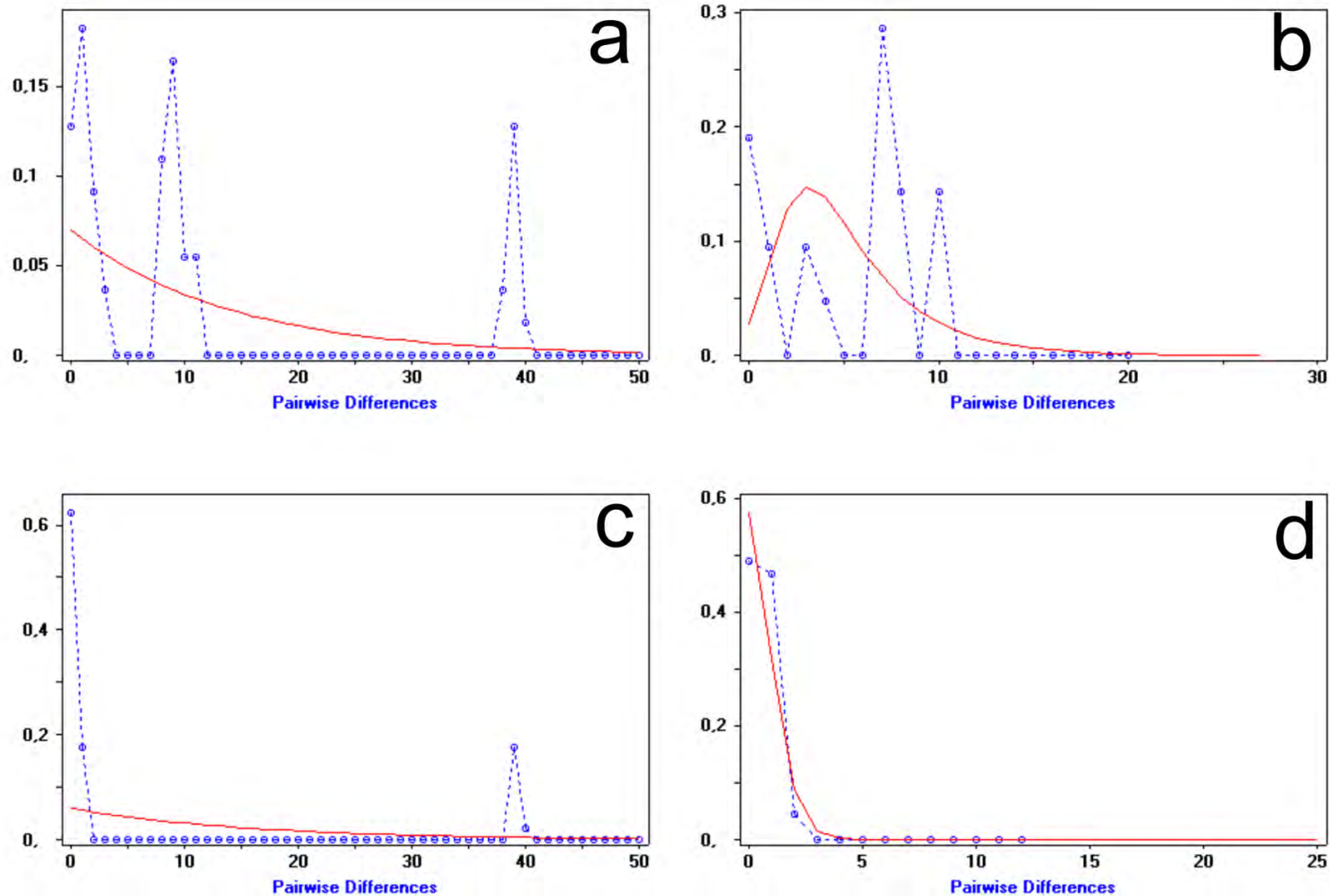
Observando la tabla 13 con los valores del estadístico  $F_s$  de Fu encontramos en primer caso que la mayoría son valores positivos (Tabla 13a). Si no consideramos los haplotipos divergentes estos valores se hacen menores en el caso de CICRA y Concepción (Tabla 13b). Sólo al considerar las secuencias agrupadas en linajes obtenemos valores negativos (Tabla 13c). Si bien estos valores no son estadísticamente significativos reflejan la posible presencia de un evento de expansión poblacional en los linajes 1 y 2.

**Tabla 13.** Valores del estadístico  $F_s$  de  $F_u$  para las localidades muestreadas (a), valores encontrados sin considerar la presencia de los haplotipos divergentes S10 y S11 (b), y agrupando a las secuencias según linajes (c)

(a)		(b)		(c)	
	<b><math>F_s</math> de <math>F_u</math></b>		<b><math>F_s</math> de <math>F_u</math></b>		<b><math>F_s</math> de <math>F_u</math></b>
<b>CM1</b>	1,792	<b>CM1</b>	1,792	<b>Linaje 1</b>	-1,382
<b>CICRA</b>	2,974	<b>CICRA</b>	1,486	<b>Linaje 2</b>	-0,375
<b>Concepción</b>	6,935	<b>Concepción</b>	-0,263	<b>Linaje 3</b>	1,653
<b>Gamitana</b>	-0,594	<b>Gamitana</b>	-0,594		
<b>Palmereto</b>	6,157	<b>Palmereto</b>	---		

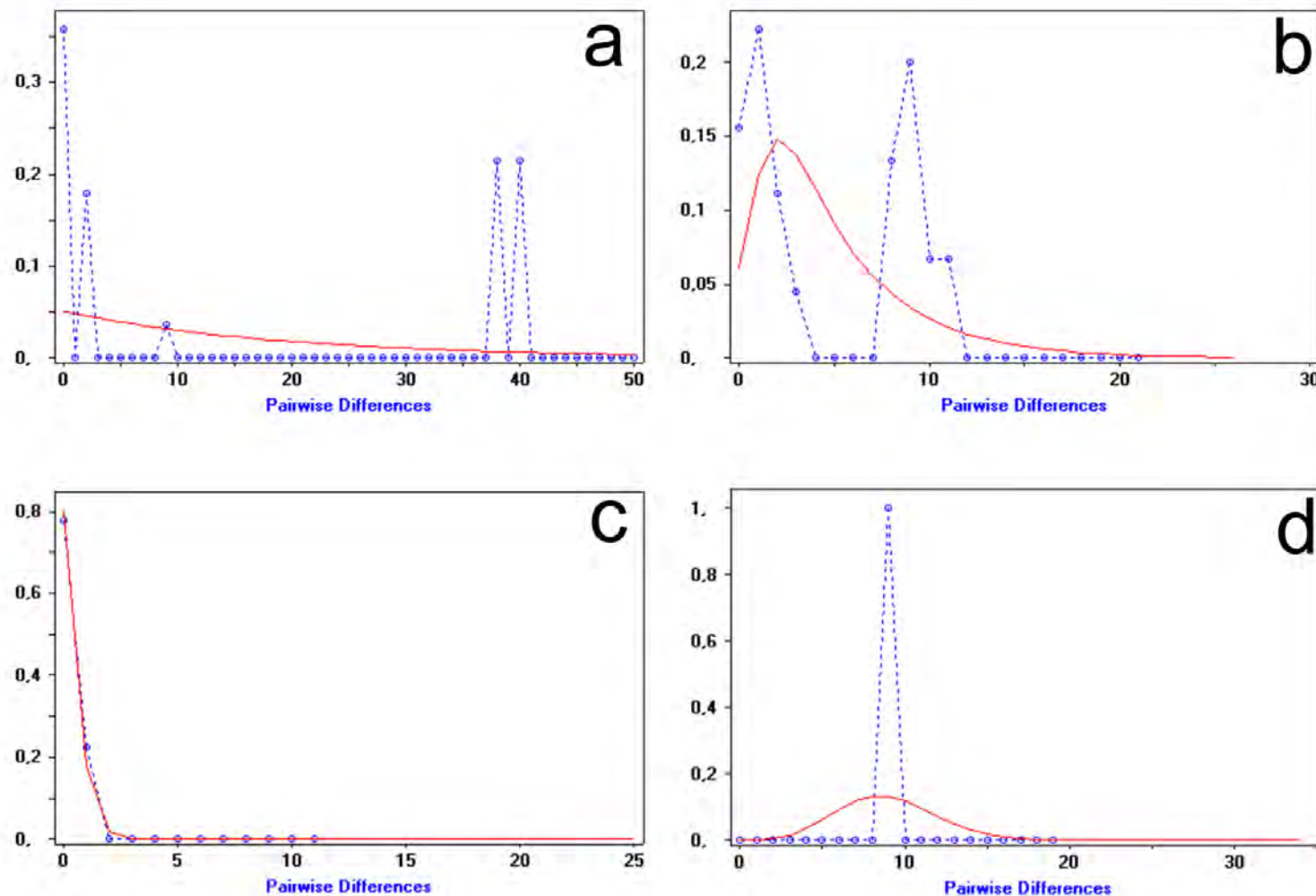
La figura 15 presenta las curvas de diferencias a pares entre las secuencias de *S. helicycloides*. Al analizar por localidades encontramos que sólo Gamitana (Fig. 15d) presenta una distribución unimodal, este resultado coincide con la baja diversidad genética encontrada para esta localidad. En los otros casos (CICRA, CM1, Concepción) las curvas demuestran la clara presencia de secuencias altamente divergentes dentro de las localidades (Fig 15, a,b,c). Palmereto también presenta secuencias altamente divergentes (Fig. 16a).

Al no tomar en cuenta a los haplotipos S10 y S11, los resultados varían observándose una menor cantidad de diferencias entre las secuencias de CICRA, Concepción y Palmereto (Fig. 16 b,c,d), sobre todo el cambio es más visible en la localidad de Concepción donde la curva se asemeja a la curva unimodal esperada (Fig. 16c). Estos resultados concuerdan con lo observado al realizar el test  $F_s$  de  $F_u$  (Tabla 12). Para el caso del análisis por linajes, sólo la gráfica del linaje 1 se asemeja a la hipótesis de una expansión poblacional súbita (Fig. 17).

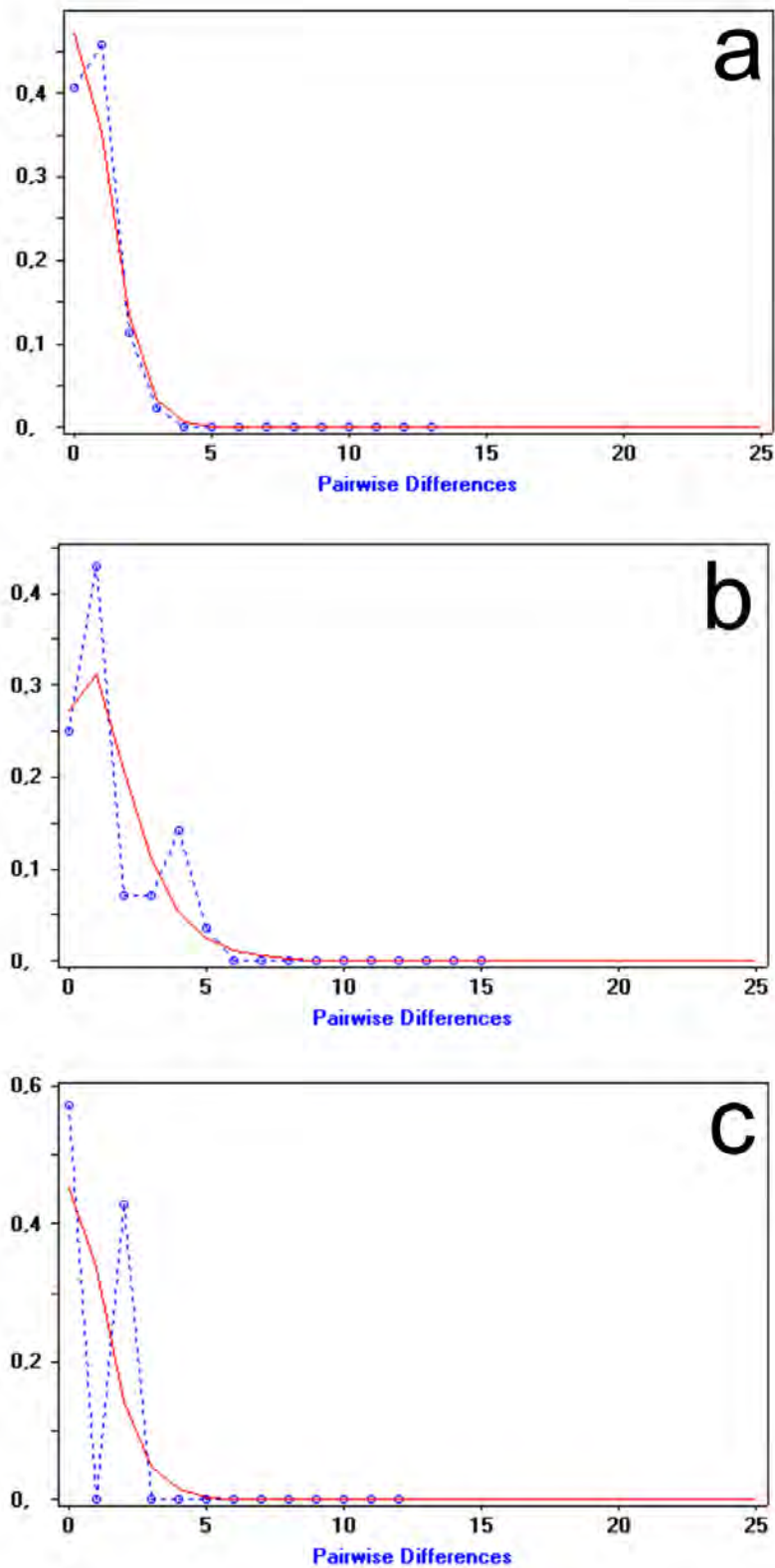


**Figura 15.** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) del marcador 16S rRNA en las poblaciones de *S. helicycloides*. El eje horizontal muestra las diferencias a pares entre las secuencias y el eje vertical su frecuencia. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un posible episodio de expansión poblacional súbita que siguió a un cuello de botella genético. (a) CICRA, (b) CM1, (c) Concepción, (d) Gamitana.





**Figura 16.** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) del marcador 16S rRNA en las poblaciones de *S. helicycloides*. El eje horizontal muestra las diferencias a pares entre las secuencias y el eje vertical su frecuencia. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un posible episodio de expansión poblacional súbita que siguió a un cuello de botella genético. (a) Palmereto, también se muestran gráficas obtenidas al no considerar los haplotipos extremadamente divergentes (S10 y S11) en las localidades de (b) CICRA, (c) Concepción y (d) Palmereto.



**Figura 17.** Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) del marcador 16S rRNA en los linajes encontrados en *S. helicycloides*. El eje horizontal muestra las diferencias a pares entre las secuencias y el eje vertical su frecuencia. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un posible episodio de expansión poblacional súbita que siguió a un cuello de botella genético. (a) Linaje 1, (b) Linaje 2, y (c) Linaje 3.

### 5.1.8 Tiempos de Divergencia

Asumiendo la hipótesis del reloj molecular es posible calcular los tiempos de divergencia entre los clados de haplotipos. Además la teoría de la coalescencia nos permite estimar el tiempo hacia el ancestro común más reciente (TMRCA). Los resultados de divergencia fueron estimados en MEGA mediante un análisis que relaciona la divergencia entre las secuencias con la tasa de mutación por unidad de tiempo; o con un análisis de coalescencia e inferencia bayesiana (BEAST) (Tabla 14a). Los resultados muestran diferencias para el caso del TMRCA, los valores provistos por MEGA son menores a los que muestra el BEAST, sin embargo se encuentran dentro de los límites de confiabilidad obtenidos en este programa. Según MEGA, el TMRCA de cada linaje ocurrió hace unos 45-55 mil años aproximadamente (Tabla 14a), según BEAST el tiempo de coalescencia es más antiguo (80-114 mil años aprox.)

Por otro lado, todos los análisis concuerdan en los tiempos de divergencia entre los clados (Tabla 14b). Para el caso de los linajes 1 y 2 (L1-L2), la divergencia debió ocurrir hace 200 mil años aprox., y si comparamos ambos linajes con el linaje 3, la divergencia debió ocurrir hace 1 millón de años aproximadamente.

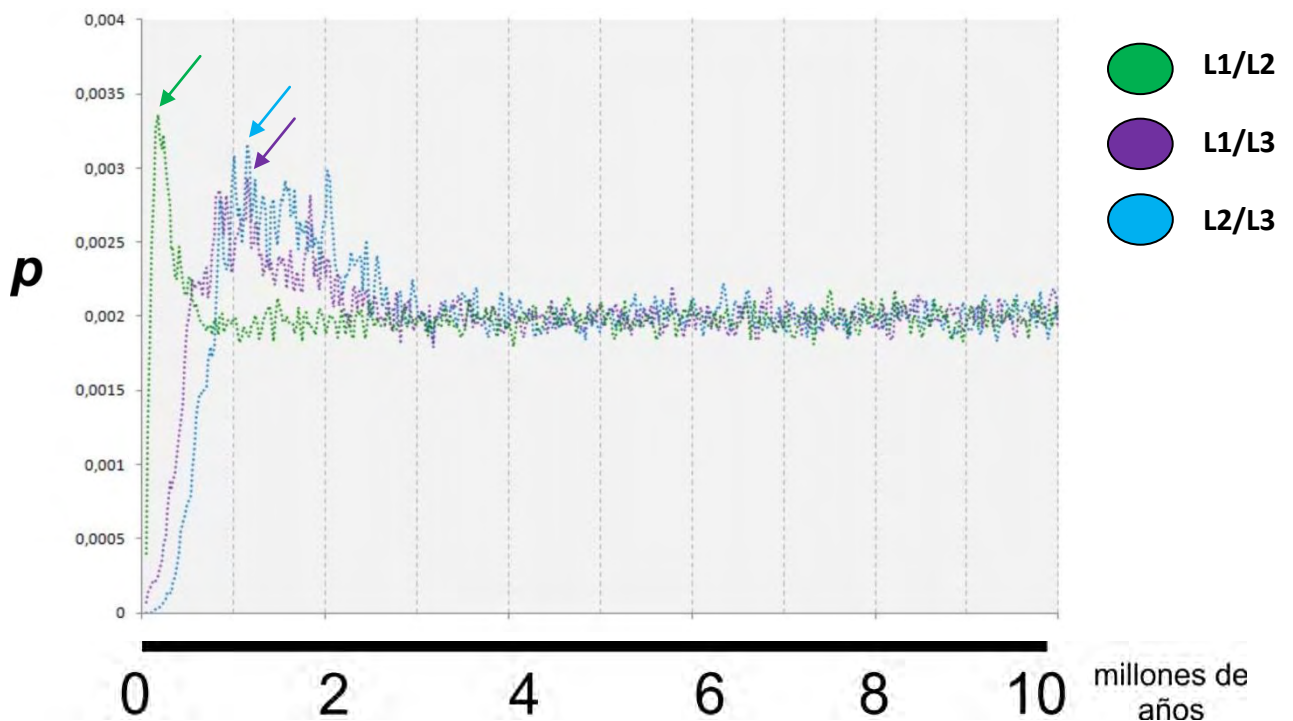
**Tabla 14.** Valores de divergencia entre los linajes encontrados para el marcador 16S rRNA de *S. helicycloides*. Los resultados indican los años transcurridos desde el periodo del ancestro común más reciente (a) o del tiempo de divergencia entre los linajes (b)

(a) TMRCA	MEGA	BEAST		
		Media	Límite inferior	Límite superior
Linaje 1	56111	114000	(41900	182000)
Linaje 2	46654	85530	(28562	152300)
Linaje 3	56023	82640	(21612	154700)

(b) Divergencia	MEGA	MDIV	BEAST		
			Media	Límite inferior	Límite superior
L1 - L2	281311	181898	273000	(155800	403200)
(L1/L2) - L3	1143075	1053774	944000	(664600	1231200)

Con el programa MDIV se obtuvo la estimativa de los tiempos de divergencia entre los linajes de *S. helicycloides*. Los resultados son presentados en una distribución de probabilidad donde el punto más alto de la curva corresponde al valor de divergencia con mayor probabilidad, este valor es convertido en años mediante el procedimiento explicado en la sección 4.14. Según el MDIV, la divergencia entre los linajes 1 y 2 habría ocurrido hace 181 mil años (Fig. 18, flecha verde); a su vez, la divergencia entre los linajes 1 y 2 con respecto al linaje 3 habría ocurrido hace 1 millón de años aproximadamente (Fig. 18, flechas celeste y morada).



**Figura 18.** Tiempos de divergencia entre los linajes de *S. helicycloides*. Las regiones con mayor probabilidad corresponden al periodo en que ocurrió la divergencia entre los linajes, la divergencia debió ocurrir en el punto con mayor probabilidad (flechas). Las curvas representan las comparaciones entre los linajes L1/L2 (verde), L1/L3 (morado) y L2/L3 (celeste). Los valores de divergencia fueron transformados en años según el procedimiento explicado en la sección 4.14.  $p$ =Probabilidad posterior. La escala representa el tiempo en millones de años.

## 5.2 Análisis del marcador mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI)

### 5.2.1 Descripción de las secuencias obtenidas

Se obtuvieron secuencias de 9 individuos de *Systrophia helycicloides*: 3 de CICRA, 3 de Palmereto, 2 de Concepción y 1 de Gamitana. Al conjunto de secuencias se agregó una secuencia de *Wayampia* de la localidad de Shatuyacu (San Martín) completando el conjunto de 10 secuencias.

La herramienta BLASTn del NCBI, confirmó la amplificación del gen mitocondrial COI en todos los individuos. Las secuencias de *S. helycicloides* resultaron similares a *Natalina beyrichi* y *Orpiella concavum* de las familias Rhytididae y Helicarionidae, respectivamente. La secuencia de *Wayampia* resultó similar a *Succinea caduca* (Succineidae) (Tabla 15). Los porcentajes de identidad se encuentran entre 82% y 84%.

La frecuencia de bases es similar entre los individuos de *S. helycicloides*. (Tabla 16), y demostró una predominancia de AT (≈70%) con respecto a CG (≈30%). Este resultado es similar a lo encontrado con el marcador 16S rRNA.

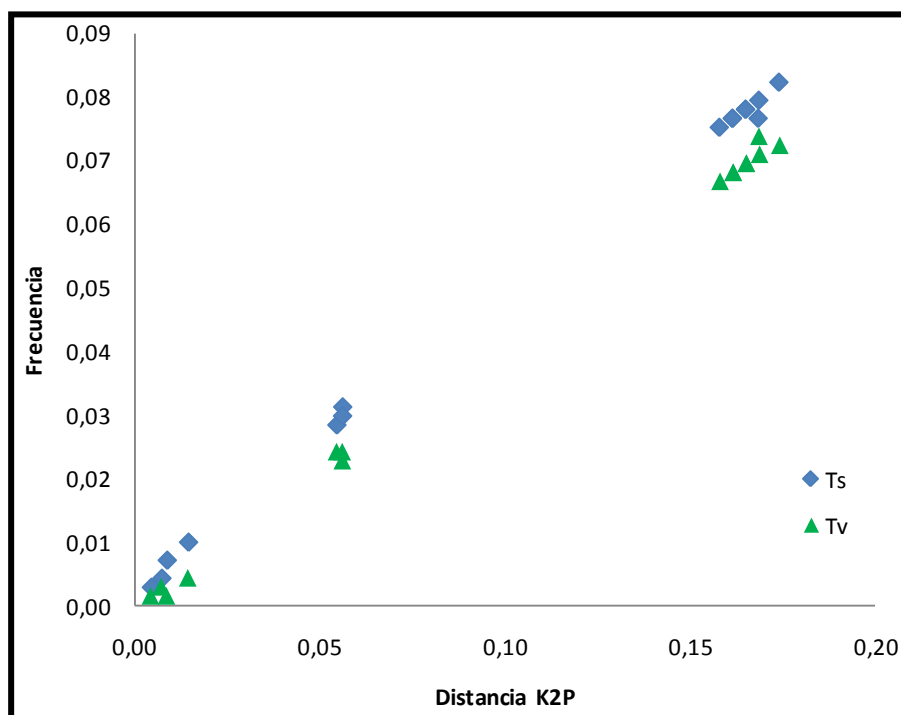
**Tabla 15.** Resultados de comparación de las secuencias COI con la herramienta BLASTn

Individuo	Mejor hit en BLASTn	Familia	Gen	# Accesión	Valor E	% Identidad
Ami Clo P20 a	<i>Natalina beyrichi</i>	Rhytididae	COI	FJ262243.1	0,0	84
Ami Clo P21 b	<i>Natalina beyrichi</i>	Rhytididae	COI	FJ262243.1	0,0	84
Ami Cic P56 6	<i>Orpiella concavum</i>	Helicarionidae	COI	EF015439.1	5,0E-179	84
Ink Con P99 i	<i>Orpiella concavum</i>	Helicarionidae	COI	EF015439.1	1,0E-175	84
Ink Gam P91 k	<i>Orpiella concavum</i>	Helicarionidae	COI	EF015439.1	3,0E-177	84
Ink Pal P23 b	<i>Natalina trimeni</i>	Rhytididae	COI	FJ262290.1	2,0E-173	83
Ink Pal P29 g	<i>Natalina trimeni</i>	Rhytididae	COI	FJ262290.1	2,0E-178	84
Ink Pal P90 j	<i>Natalina trimeni</i>	Rhytididae	COI	FJ262290.1	2,0E-178	84
Ink Con P61 m	<i>Natalina trimeni</i>	Rhytididae	COI	FJ262290.1	2,0E-173	83
Wayampia P43	<i>Succinea caduca</i>	Succineidae	COI	DQ658675.1	1,0E-141	82

**Tabla 16.** Frecuencia de bases nitrogenadas del gen COI para cada población de *Systrophia helicycloides*. Long.=Longitud de las secuencias, N=Número de secuencias

	T	C	A	G	Long.	N
<b>CICRA</b>	39,4	14,0	28,1	18,6	706	3
<b>Concepción</b>	38,7	15,0	27,9	18,3	706	2
<b>Palmereto</b>	38,3	16,0	28,0	17,7	706	3
<b>Gamitana</b>	39,7	13,6	27,8	19,0	706	1
<b>Promedio</b>	39,0	14,6	27,9	18,4	706	

Las transiciones y transversiones tienen una distribución similar dentro de las secuencias y no presentan un grado evidente de saturación (Fig. 19). En esta figura se observa que existen tres tipos de grupos de secuencias, altamente similares, otras medianamente similares y algo más divergentes.

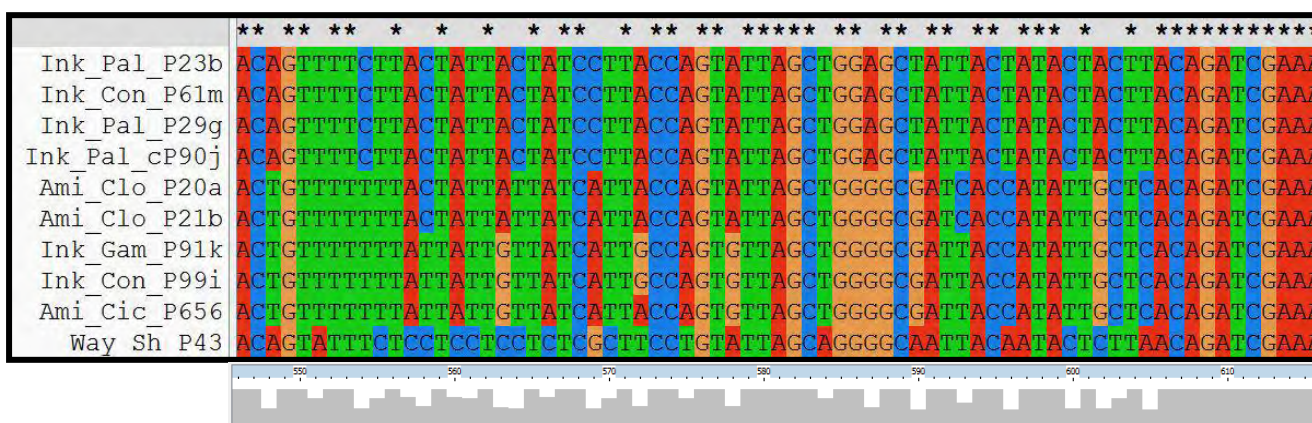


**Figura 19.** Transiciones y tranversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias COI de *S. helicycloides*.

### 5.2.2 Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento múltiple de las 10 secuencias COI utilizadas resultó en 706 sitios alineados, sin observarse la presencia de *indels* (eventos de inserción o delección en la secuencia de nucleótidos). El alineamiento presentó 513 sitios conservados, 193 posiciones variables y 124 sitios informativos, estos últimos se presentan en la tabla 16.

El alineamiento presenta un alto grado de conservación (Fig. 20). Las diferencias entre las secuencias se deben a mutaciones puntuales a lo largo del alineamiento. Las primeras 25 posiciones corresponden al sitio de hibridación del primer LCO 1490. La última porción del alineamiento múltiple también se encuentra bastante conservada y corresponde al sitio de hibridación del primer HCO 2198. Dentro del alineamiento se pueden observar grupos de secuencias, con similitud en mutaciones. Por ejemplo las secuencias de Concepción y Palmereto. Lo mismo ocurre si observamos las secuencias de Cocha Lobo (CICRA). La secuencia de *Wayampia* queda separada de las demás debido a su gran número de mutaciones con respecto a las secuencias de *Systrophia* (Tabla 17).



**Figura 20.** Porción del alineamiento múltiple de secuencias COI donde se puede apreciar las mutaciones compartidas entre los individuos. El alineamiento fue realizado con el programa Clustal X 2.0. Los asteriscos representan las posiciones conservadas. Las secuencias pertenecen a la zona de Los Amigos (Ami) o del Bajo Madre de Dios (Ink). Los códigos de las secuencias de *S. helicycloides* corresponden a las localidades Cic/Clo (CICRA), Con (Concepción), Pal (Palmereto) y Gam (Gamitana). Way=*Wayampia* sp.

**Tabla 17.** Sitios polimórficos informativos en el alineamiento múltiple de secuencias del marcador mitocondrial COI en *Systrophia helicycloides*. Hap=Haplotipo, Los individuos de *S. helicycloides* están codificados por la zona de donde provienen: Los Amigos (Ami) y Bajo Madre de Dios (Ink), y por localidades: Cic/Clo (CICRA), Pal (Palmereto), Con (Concepción), Gam (Gamitana)

[illegible][illegible]



### 5.2.3 Diversidad Genética

El análisis de diversidad genética para el marcador mitocondrial COI se realizó utilizando sólo las secuencias de *Systrophia helicycloides*. El nuevo alineamiento también consistió en 706 sitios, y presentó 581 sitios conservados, 125 posiciones variables y 124 sitios informativos. Se encontraron 6 haplotipos para las 9 secuencias estudiadas (Tabla 20). La diversidad genética fue de 0,917, el valor  $P_i$  de diversidad nucleotídica fue de 0,09348.

Los haplotipos de CICRA se asemejan a los encontrados en Gamitana y Concepción. Sin embargo, existen grandes diferencias con respecto a los haplotipos de Palmereto. Sólo se encontró la presencia de haplotipos compartidos entre las localidades de Palmereto y Concepción (Tabla 18).

**Tabla 18.** Distribución de los haplotipos COI dentro de las localidades muestreadas. N=Frecuencia total del haplotipo

Localidad	Haplotipos						Total
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
<b>CICRA</b>			1	2			3
<b>Concepción</b>		1			1		2
<b>Gamitana</b>	1						1
<b>Palmereto</b>					1	2	3
<b>N</b>	1	1	1	2	2	2	9

Las distancias genéticas entre los individuos van desde 0% hasta 16,6%. Palmereto presentó gran diferencia con respecto a las demás poblaciones. En casi todos los casos se observa que la distancia genética dentro y entre las poblaciones supera el valor de 2% (ver sección *Barcoding*) y supone la presencia de haplotipos muy divergentes en las localidades (Tabla 19).

**Tabla 19.** Distancia genética (K2P) para las secuencias COI dentro de cada localidad (diagonal) y entre localidades (bajo la diagonal)

	<b>CICRA</b>	<b>Concepción</b>	<b>Gamitana</b>	<b>Palmereto</b>
<b>CICRA</b>	0,037			
<b>Concepción</b>	0,105	0,165		
<b>Gamitana</b>	0,039	0,086	0,000	
<b>Palmereto</b>	0,166	0,086	0,166	0,010

**Tabla 20.** Sitios polimórficos en los 6 haplotipos del marcador mitocondrial COI en *Systrophia helicycloides*. H=Haplotipo. N=Frecuencia del haplotipo. Pob=Población. Localidades: Gam=Gamitana, Con= Concepción, Pal=Palmereto, Cic=CICRA

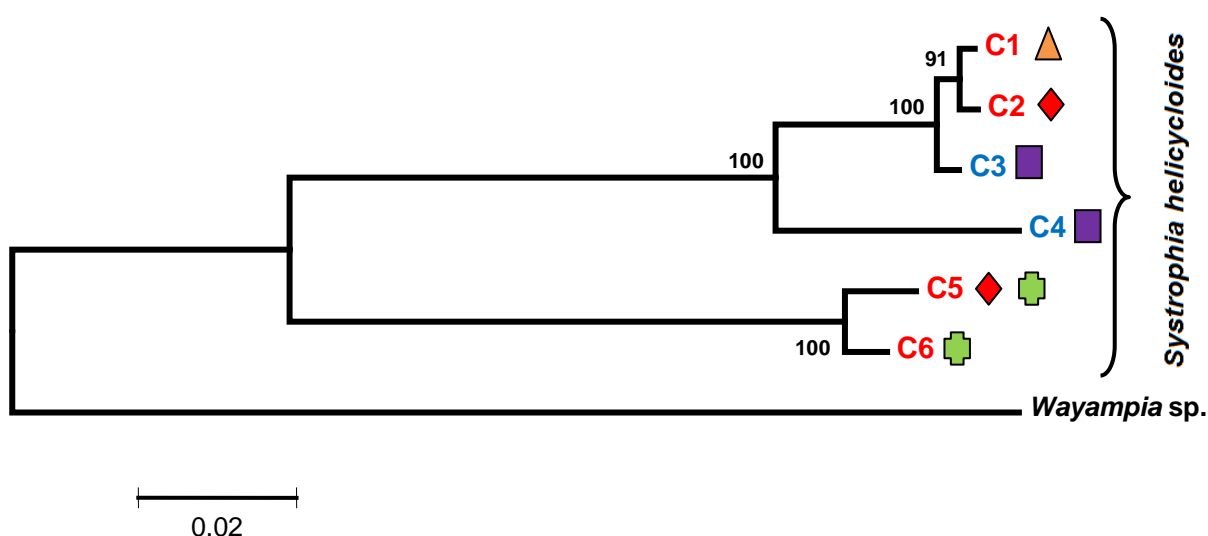
	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2																																												
H	2	3	3	3	4	4	5	5	5	6	6	6	6	7	7	8	8	8	0	0	0	1	1	1	2	3	4	4	5	5	6	7	8	9	9	0	0	1	1	2	2	2	2	N	Pob
	6	0	2	8	1	4	3	6	9	0	5	8	9	1	4	0	1	3	1	4	7	3	6	9	2	1	3	4	2	5	7	3	5	2	4	3	6	2	5	2	4	8			
C1	A	T	G	G	A	T	G	C	A	T	A	A	T	A	G	T	A	T	A	T	T	A	G	G	G	T	T	A	A	A	A	T	A	G	A	A	A	G	T	A	T	T	1	Gam	
C2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	Con
C3	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	Cic
C4	T	C	.	A	.	C	.	T	.	.	.	.	A	T	C	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	T	.	A	.	.	.	C	.	.	2	Cic	
C5	T	.	A	A	T	.	A	.	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	T	A	A	C	A	A	A	A	A	G	.	C	T	C	.	A	C	.	T	A	C	G	C	.	2	Pal/Con	
C6	T	.	A	A	T	.	A	.	T	C	T	G	A	T	C	A	G	G	T	A	A	T	A	A	A	A	A	G	.	C	T	C	.	A	C	.	.	A	C	G	C	.	2	Pal	

H	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

H	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	N	Pob
	6	7	7	8	8	9	9	0	1	1	1	2	2	2	2	3	4	5	5	6	6	6	7	7	8	9	9	9	0	0	0	2	3	4	4	4	5	5	5	5	7			
	4	0	6	5	8	4	5	0	2	5	8	1	2	4	7	0	8	4	8	3	4	9	2	8	7	0	3	6	0	2	5	9	8	1	4	7	0	3	6	9	1			
C1	C	T	A	T	A	T	A	A	A	A	T	A	T	A	T	T	T	T	G	T	A	G	G	G	G	T	C	T	G	C	G	T	T	G	T	T	G	T	T	A	1	Gam		
C2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	Con	
C3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	Cic	
C4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	C	A	.	.	A	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	A	A	.	A	.	.	2	Cic		
C5	.	C	T	C	G	C	T	T	G	C	C	G	C	.	.	C	A	C	C	A	C	C	A	A	A	T	.	T	C	A	T	A	C	A	A	G	.	A	C	.	G	2	Pal/Con	
C6	T	C	T	.	G	C	T	T	G	C	C	G	C	.	.	C	A	C	C	A	C	C	A	A	A	T	.	T	C	A	T	A	C	A	A	G	.	A	.	.	G	2	Pal	

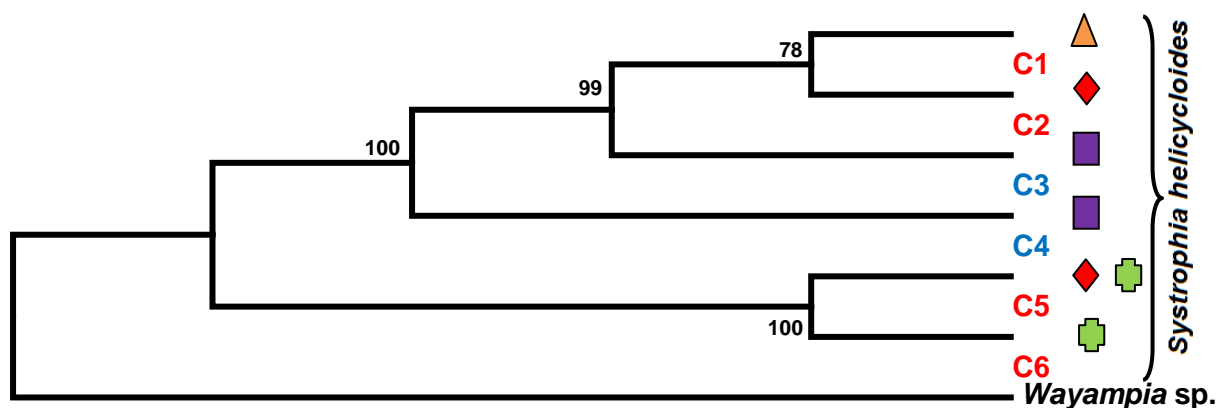
#### 5.2.4 Análisis Filogenético

La filogenia intraespecífica de los haplotipos COI se presenta en la figura 21. La secuencia de *Wayampia* queda claramente diferenciada del grupo de *Systrophia*. Dentro de los haplotipos de *Systrophia helicycloides* se aprecia que los haplotipos C5 y C6, compuesto de individuos de Palmereto y Concepción, forman un grupo claramente diferenciado de los demás (*bootstrap*=100%). Los haplotipos C1 y C2, también de Inkaterre, forman un grupo fuertemente sustentado (*bootstrap*=91) y relacionado al haplotipo C3 presente en Los Amigos.

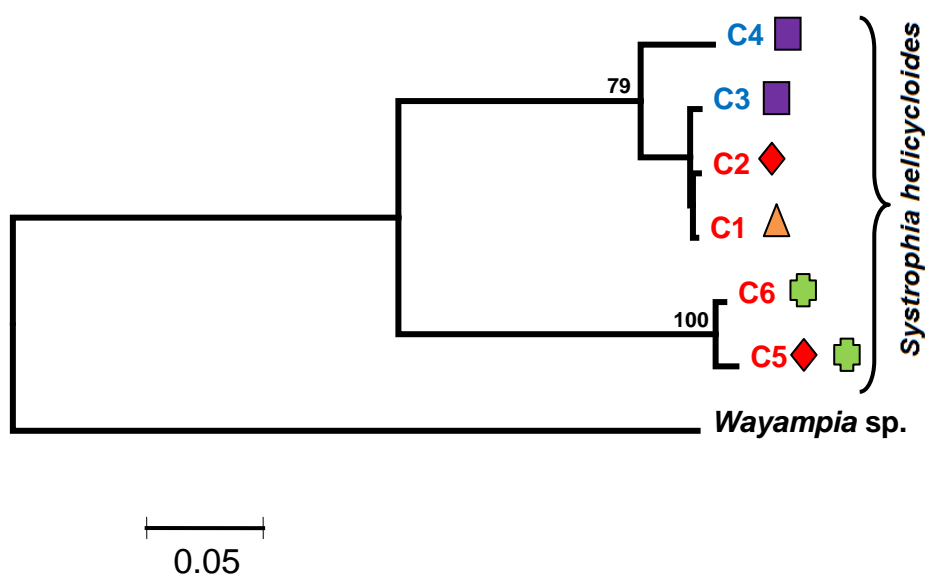


**Figura 21.** Filogenia NJ para los haplotipos COI de *S. helicycloides*. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterre de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%. La escala representa 2 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

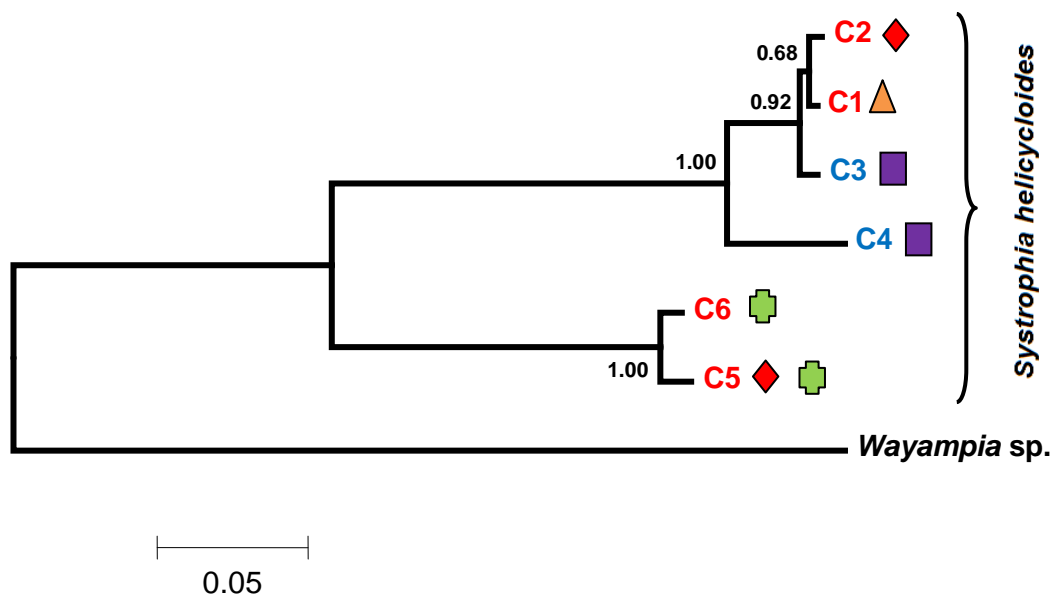
Los análisis de máxima parsimonia (Fig. 22), máxima verosimilitud (Fig. 23), y de inferencia bayesiana (Fig. 24) produjeron resultados similares. El clado C5-C6 (haplotipos altamente divergentes) se encuentra fuertemente soportado y el clado C1-C2 (Gamitana/Concepción) es medianamente sustentado.



**Figura 22.** Filogenia MP de los haplotipos COI. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%.



**Figura 23.** Filogenia ML de los haplotipos COI. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%. La escala representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.



**Figura 24.** Relaciones filogenéticas entre los haplotipos COI de *S. helicycloides*, reconstruidas a partir de inferencia bayesiana. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Los valores numéricos indican la probabilidad posterior de los clados con mayores probabilidades. La escala representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

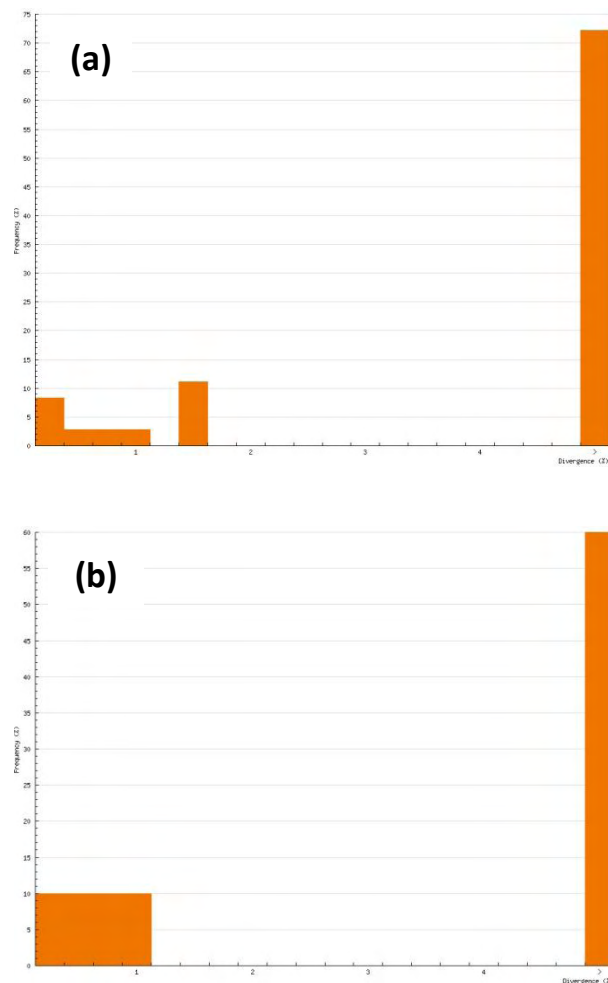
### 5.2.5 Barcoding

Para observar un ejemplo de los *barcodes* se utilizaron dos haplotipos COI C5 (Inkaterra) y C4 (Los Amigos). Al introducir las secuencias en la base de datos BOLD (*Barcode of Life* – [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)), éstas son mostradas de manera gráfica a manera de un código de barras (Fig. 25).



**Figura 25.** Códigos de barras observados en la base de datos BOLD para los haplotipos COI: C4 (Los Amigos, a) y C5 (Inkaterra, b). Los colores representan a las bases nitrogenadas

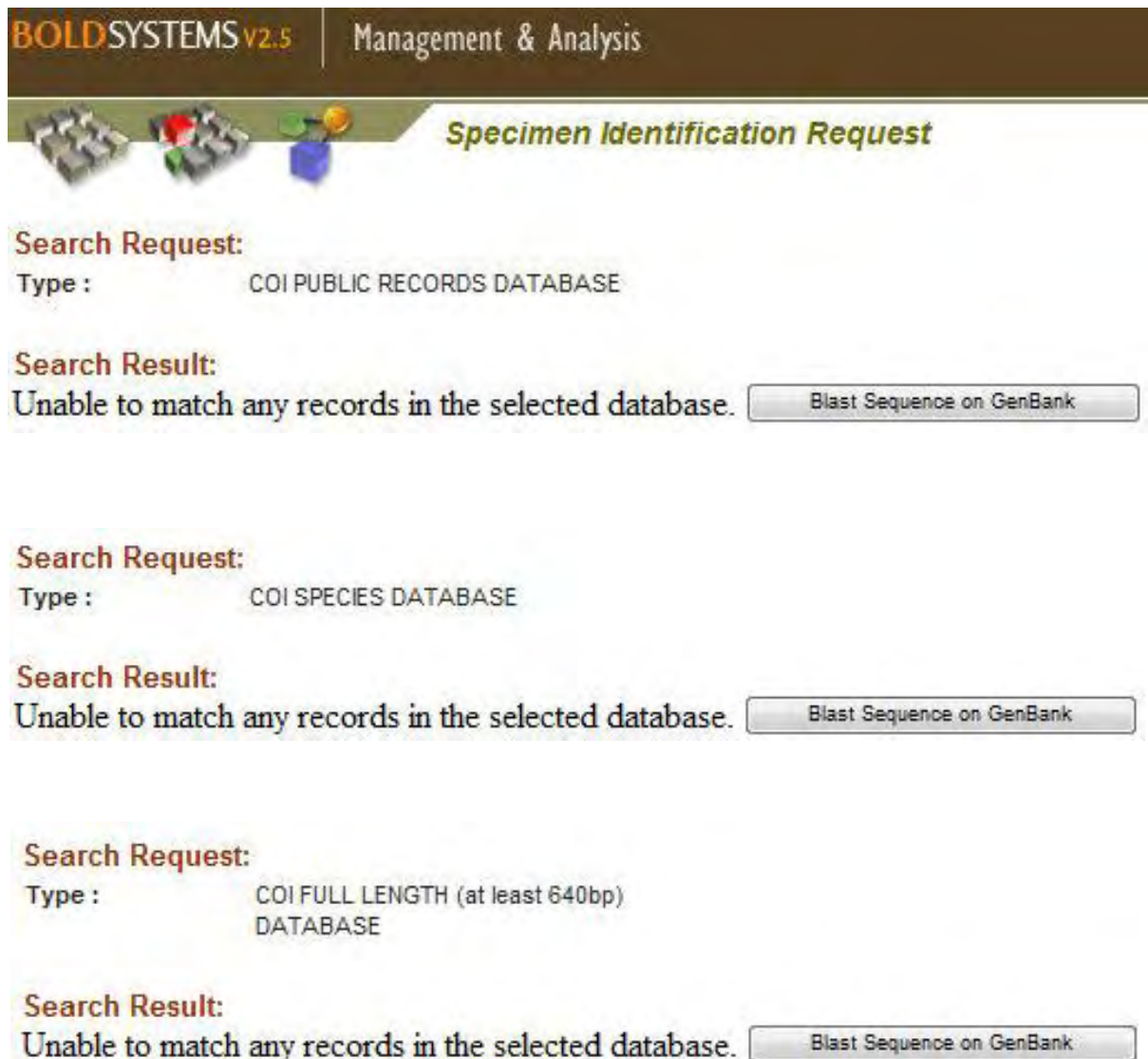
La divergencia total entre todas las secuencias de *Systrophia helicycloides* fue en promedio de 10%; si no consideramos las secuencias de los haplotipos divergentes C5 y C6 el promedio de distancias entre las secuencias baja a 5% (Fig. 26). En ambos casos estos valores superan el valor de 2% considerado como límite específico.



**Figura 26.** Distancias intraespecíficas considerando todas las secuencias COI (a) y sin considerar a los haplotipos C5 y C6 (b).

Al realizar las diferentes opciones de comparación utilizando como ejemplo a los haplotipos C4 y C5 no se encontraron secuencias idénticas en las bases de datos: COI Public Records, COI Species y COI Full length (Fig. 27). Las secuencias obtenidas para *Systrophia helicycloides* son las primeros perfiles COI para esta especie subidos a la base de datos del BOLD.

Sólo hubo coincidencia cuando se realizó la comparación con Full Database. Sin embargo, los porcentajes de similitud resultaron menores a 85% (Fig. 28, 29). Al comparar ambos haplotipos con la base de datos, las secuencias presentaron una mayor similitud con las familias de moluscos terrestres Rhytididae, Hygromiidae, Amastridae y Helicarionidae.



**BOLD SYSTEMS v2.5** | Management & Analysis

**Specimen Identification Request**

**Search Request:**  
Type : COI PUBLIC RECORDS DATABASE

**Search Result:**  
Unable to match any records in the selected database. [Blast Sequence on GenBank](#)

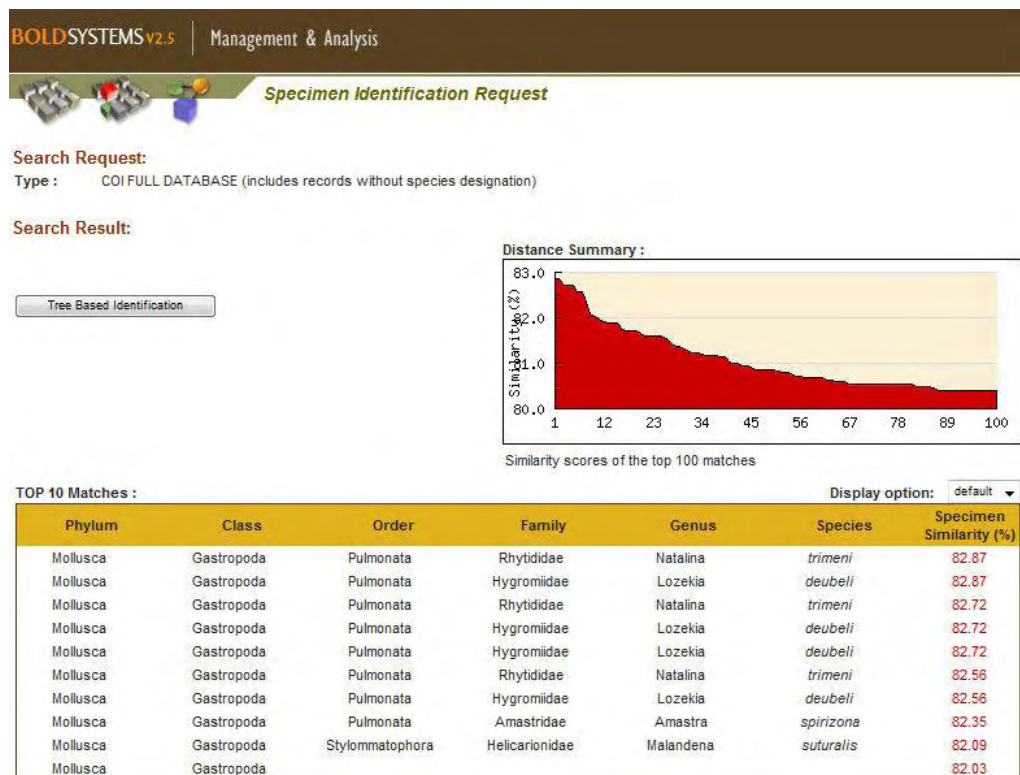
**Search Request:**  
Type : COI SPECIES DATABASE

**Search Result:**  
Unable to match any records in the selected database. [Blast Sequence on GenBank](#)

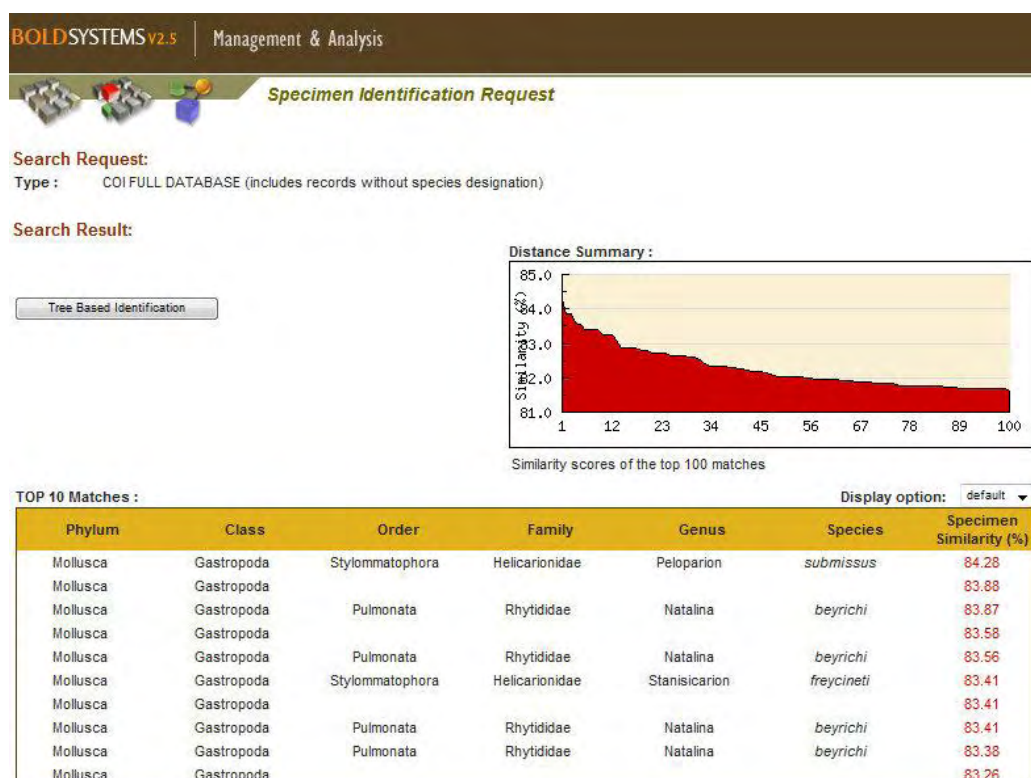
**Search Request:**  
Type : COI FULL LENGTH (at least 640bp) DATABASE

**Search Result:**  
Unable to match any records in the selected database. [Blast Sequence on GenBank](#)

**Figura 27.** Resultados al comparar las secuencias con las bases de datos de BOLD.



**Figura 28.** Resultados al comparar el haplotipo C4 con la COI FULL DATABASE del BOLD.



**Figura 29.** Resultados al comparar el haplotipo C5 con la COI FULL DATABASE del BOLD.



### 5.3 Análisis filogenético de los marcadores concatenados

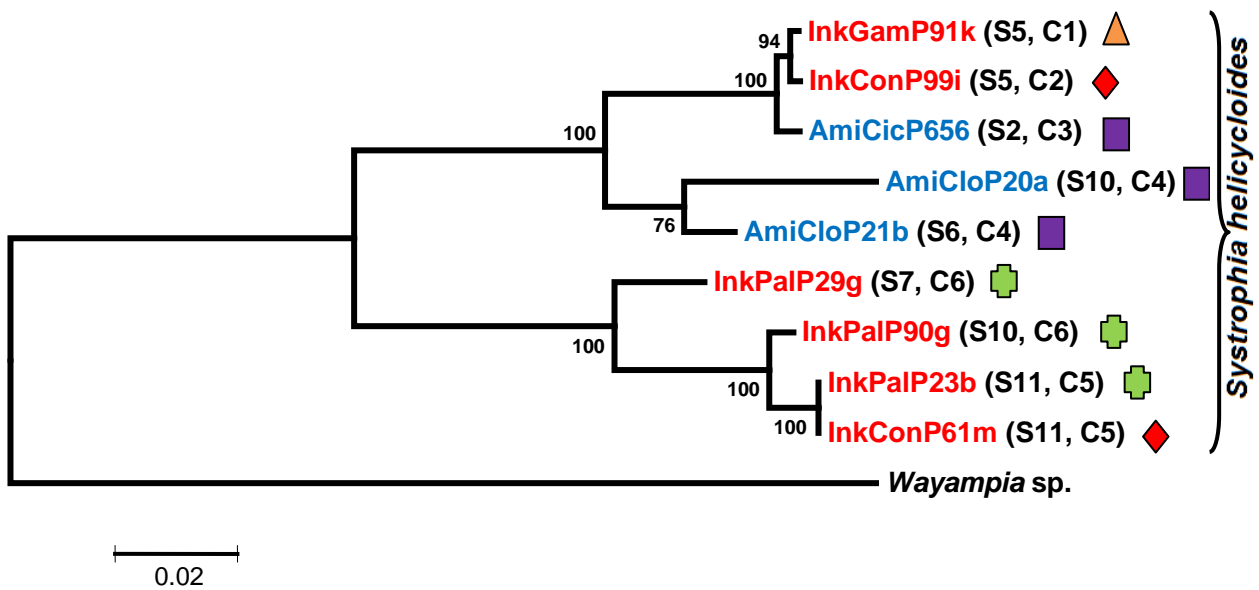
Ambos marcadores 16S rRNA y COI fueron amplificados exitosamente en 9 individuos de *S. helicycloides* y 1 de *Wayampia*. Ambas secuencias fueron concatenadas en una sola y se procedió a realizar el análisis filogenético a partir de este conjunto de datos combinados. La Tabla 21 muestra los individuos de *S. helicycloides* utilizados en el análisis.

**Tabla 21.** Individuos de *S. helicycloides* utilizados en el análisis con los marcadores concatenados. Se muestra también los haplotipos 16S rRNA y COI a los que pertenece cada individuo

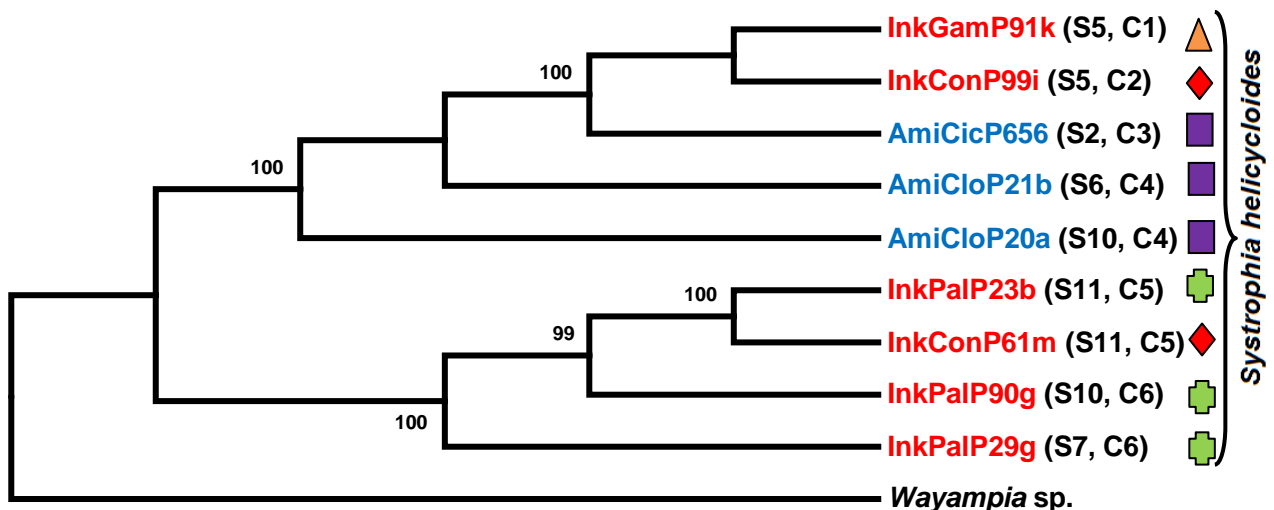
Localidad	Individuo	Haplotipo	
		16S rRNA	COI
CICRA	AmiCicP656	S2	C3
	AmiCloP20a	S10	C4
	AmiCloP21a	S6	C4
Concepción	InkConP61m	S11	C5
	InkConP99i	S5	C2
Gamitana	InkGamP91k	S5	C1
	InkPalP23b	S11	C5
Palmereto	InkPalP29g	S7	C6
	InkPalP90g	S10	C6

El alineamiento utilizando ambos marcadores concatenados resultó en 1041 sitios alineados, 723 posiciones conservadas, 289 sitios variables y 168 sitios informativos.

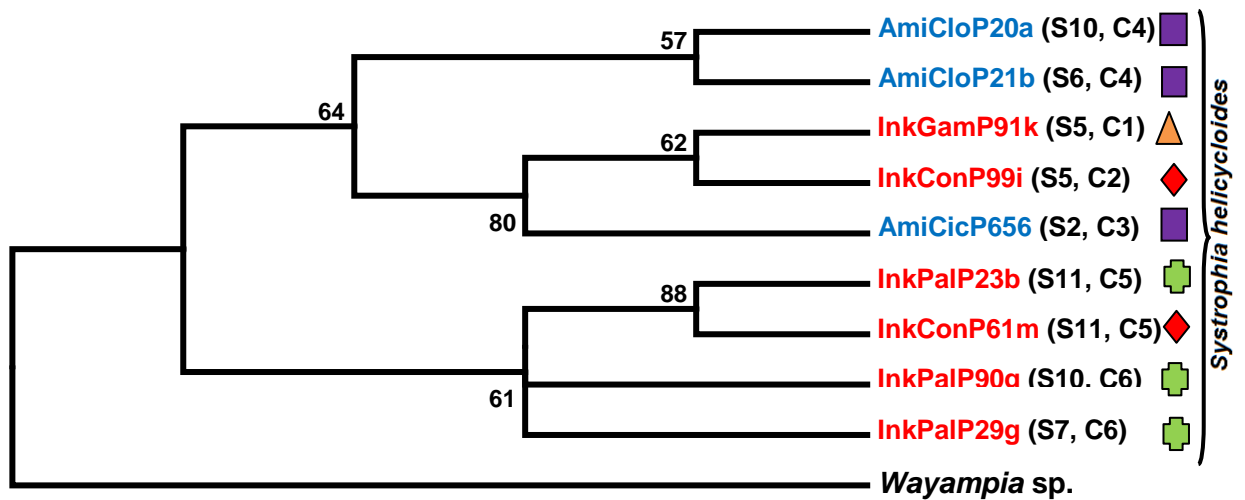
Observando los árboles NJ, MP, ML encontramos resultados similares (Figs. 30, 31, 32): Un clado que agrupa las secuencias de Inkaterra (Palmereto y Concepción) (*bootstrap*=100%), que diverge del clado que contiene a las secuencias de Los Amigos, una secuencia de Gamitana y otra de Concepción.



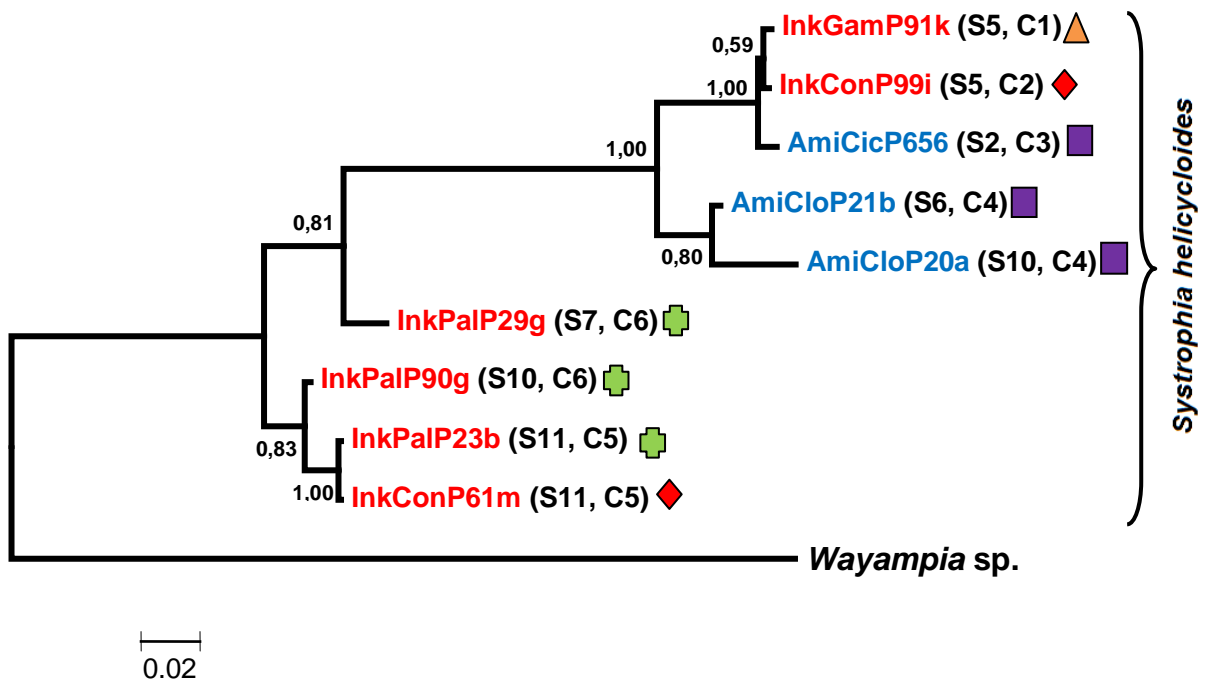
**Figura 30.** Filogenia NJ para los dos marcadores mitocondriales concatenados. Se indica a que haplotipo (16S rRNA, COI) pertenece cada secuencia. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%. La escala representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.



**Figura 31.** Filogenia MP de los marcadores mitocondriales concatenados. Se indica a que haplotipo (16S rRNA, COI) pertenece cada secuencia. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterra de color rojo. Se muestran sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70%.



**Figura 32.** Filogenia ML de los marcadores mitocondriales concatenados. Se indica a que haplotipo (16S rRNA, COI) pertenece cada secuencia. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterro de color rojo. Obsérvese la presencia de varios grupos con valores de *bootstrap* menores a 70%.



**Figura 33.** Relaciones filogenéticas entre los individuos de *S. helicycloides* reconstruidas a partir de inferencia bayesiana con los marcadores concatenados. Se indica a que haplotipo (16S rRNA, COI) pertenece cada secuencia. Las localidades están representadas con un símbolo: CICRA (cuadrado), Gamitana (triángulo), Palmereto (cruz), Concepción (rombo). Los haplotipos restringidos a la zona de Los Amigos son de color azul y a Inkaterro de color rojo. Los valores numéricos indican la probabilidad posterior de los clados con mayor probabilidad. La escala representa 2 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

El árbol construido por inferencia bayesiana (Fig, 33) difiere en la adición de la secuencia Pal29g de la zona de Palmereto (Inkaterra) al clado superior, aunque la probabilidad es sólo de un 80%. Obsérvese también la secuencia CloP20a de Los Amigos que en los árboles para el 16S rRNA aparecía como un haplotipo muy divergente (linaje 3, Fig. 10) ahora se encuentra dentro del grupo de haplotipos de los linajes 1 y 2 (S1-S9)

Los resultados en general coinciden con lo encontrado en el análisis para cada marcador en particular. Las secuencias que aparecen en el clado inferior son aquellas que representan a los haplotipos altamente divergentes tanto para 16S rRNA como para COI (S10, S11, C5 y C6). El clado superior también presenta el mismo patrón observado en el análisis de cada gen, un grupo de secuencias principalmente de Los Amigos separado de otro grupo de secuencias de Los Amigos e Inkaterra.

## 6. DISCUSIÓN

La distribución de la especie *Systrophia helicycloides* (d'Orbigny, 1835) en las localidades de la cuenca de Los Amigos (CM1, CICRA) y en la cuenca del Bajo Madre de Dios (Gamitana, Concepción y Palmereto) abarcó un rango de aproximadamente 120 kilómetros lineales, su distribución a lo largo de estas cuencas la hacen un modelo interesante en el estudio de la estructura genético-poblacional de moluscos terrestres en la Amazonia, así como de las causas que provocan esta estructura.

### 6.1 El primer paso: Comparación de secuencias

En el presente trabajo se utilizaron dos genes mitocondriales: 16S rRNA (subunidad mayor del RNA ribosomal) y COI (citocromo c oxidasa subunidad I). El contenido de Adenina y Timina encontrado en ambos genes (alrededor del 70%) es alto, y concuerda con lo indicado por Hatzoglou *et al.* (1995) para el caso del caracol *Albinaria coerulea*. Este exceso de A-T también fue reportado por Lydeard *et al.* (2000), quienes indican que a pesar de ser un valor elevado, es menor que el valor encontrado en la clase Insecta.

El primer paso de comparación usando BLASTn, es un análisis simple pero importante para confirmar la amplificación y el secuenciamiento del segmento de genoma deseado, y encontrar errores o contaminación en los procedimientos (Britton *et al.*, 2007). La comparación de secuencias COI con la base de datos del *Genbank* produjo resultados similares (*matches*) con las familias de moluscos terrestres Rhytididae y Helicarionidae. *Systrophia* ha sido agrupada dentro de Rhytidoidea (Hausdorf y Bouchet, 2005), aunque curiosamente Boss (1982) también considera a *Systrophia* como miembro de otro grupo, conocido como clado “limacoideo” (donde se encuentra Helicarionidae) (Wade *et al.*, 2006). Además, si analizamos el caso de las secuencias del 16S rRNA, todas resultan similares a la familia de moluscos acuáticos Planorbidae, lo que evidencia la falta de secuencias altamente similares (sólo se encontraron secuencias con similitudes menores al 80%). Estos resultados sólo refuerzan la necesidad de un estudio taxonómico mayor de la familia Scolodontidae usando datos morfológicos y moleculares para resolver su posición evolutiva.

Al revisar el alineamiento múltiple de las secuencias del gen 16S rRNA, se observó que la mayoría de *gaps* formados eran producidos por *Systrophia eatoni* y *Wayampia* sp. Se observó también que existían secuencias de individuos parecidas entre sí, algunas de ellas restringidas a una sola población y otras presentes en varias poblaciones. Las secciones, primera y final, del alineamiento correspondieron a segmentos bien conservados y verifican la efectividad de los *primers* específicos diseñados por Ramírez (2004). Para el caso de COI, se corroboró la gran diferencia entre la secuencia de *Wayampia* sp., comparada con las de *Systrophia*. Aquí también se verificó la efectividad de los *primers* diseñados por Folmer *et al.* (1994) para la amplificación del gen COI en moluscos terrestres.

## **6.2 Causas de la gran divergencia intraespecífica**

Los análisis filogenéticos (Neighbour Joining, Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud, Inferencia Bayesiana) de los genes 16S rRNA y COI, así como de los marcadores concatenados demostraron la presencia de tres clados separados dentro de *S. helicycloides*. La filogenia muestra también que la diferenciación entre los individuos no tiene una relación directa con la estructura geográfica de las poblaciones.

El análisis filogenético diferenció a individuos correspondientes a los haplotipos S10 y S11 (16S rRNA), o C5 y C6 (COI) correspondientes a individuos de Palmereto (Inkaterra) principalmente, debido a la gran cantidad de mutaciones con respecto a las demás secuencias. La presencia de tal divergencia puede ser explicada a manera de preservación de polimorfismos ancestrales, evento característico en poblaciones de moluscos terrestres debido a su particular estructura poblacional (Thomaz *et al.*, 1996) o por una elevada tasa de mutación (Chiba, 1999). La extrema divergencia también puede darse debido a una mayor acumulación de mutaciones debido a que los moluscos terrestres presentan los tamaños génicos más pequeños reportados para los metazoos celomados (Lydeard *et al.*, 2000). Dentro de los moluscos, son los Heterobranchia (Hazprunar, 1985), el grupo al cual pertenecen los gasterópodos pulmonados como *Systrophia*, los que poseen los genomas mitocondriales más pequeños (Kurabayashi y Ueshima, 2000).

Otra forma de estudiar la extrema divergencia es utilizando la estructura secundaria del 16S rRNA. Se conoce que esta estructura puede mantenerse conservada aún cuando cambie la secuencia que la conforma (Gutell *et al.*, 1994). Si es así, ¿cómo se explica la alta tasa de mutación?, para ello se deben observar la presencia de mutaciones compensatorias a lo largo de los *stems* del rRNA, cambios que permiten la modificación de la secuencia sin alterar la estructura de la molécula (Ramirez, 2009), y que pueden duplicar la tasa de mutación; además, existen zonas (como los *loops*) que se encuentran sometidas a una menor presión selectiva, por lo que la sustitución de bases es más frecuente (Smit *et al.*, 2007).

Otras causas pueden ser (1) la coamplificación de regiones duplicadas (Campbell y Barker, 1999), (2) heteroplásmicas (Frey y Frey, 2004) o (3) pseudogenes generados por integración en el genoma nuclear (Bensasson *et al.*, 2001). Sin embargo, ambos genes estudiados se encuentran en posiciones diferentes del genoma mitocondrial y producen resultados similares, proporcionando poco apoyo a estas hipótesis. Cabe resaltar que la aparición de secuencias altamente divergentes en las especies de moluscos terrestres no es un resultado aislado; en cambio, ha sido una constante en los resultados obtenidos en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía trabajando con moluscos del Perú (Romero, 2008; Chumbe, 2009; Ramirez, 2009; Congrains, 2010). Estos resultados concuerdan con la gran divergencia encontrada en los moluscos terrestres por Chiba (1999) y Thomaz *et al.* (1996) para los genes mitocondriales 16S y 12S rRNA, respectivamente.

### 6.3 El “misterio de los misterios”

*"When on board H.M.S. Beagle as naturalist, I was much struck with certain facts in the distribution of the organic beings inhabiting South America, and in the geological relations of the present to the past inhabitants of that continent. These facts, as will be seen in the latter chapters of this volume, seemed to throw some light on the origin of species- that mystery of mysteries, as it has been called by one of our greatest philosophers"* (Darwin, 1859).

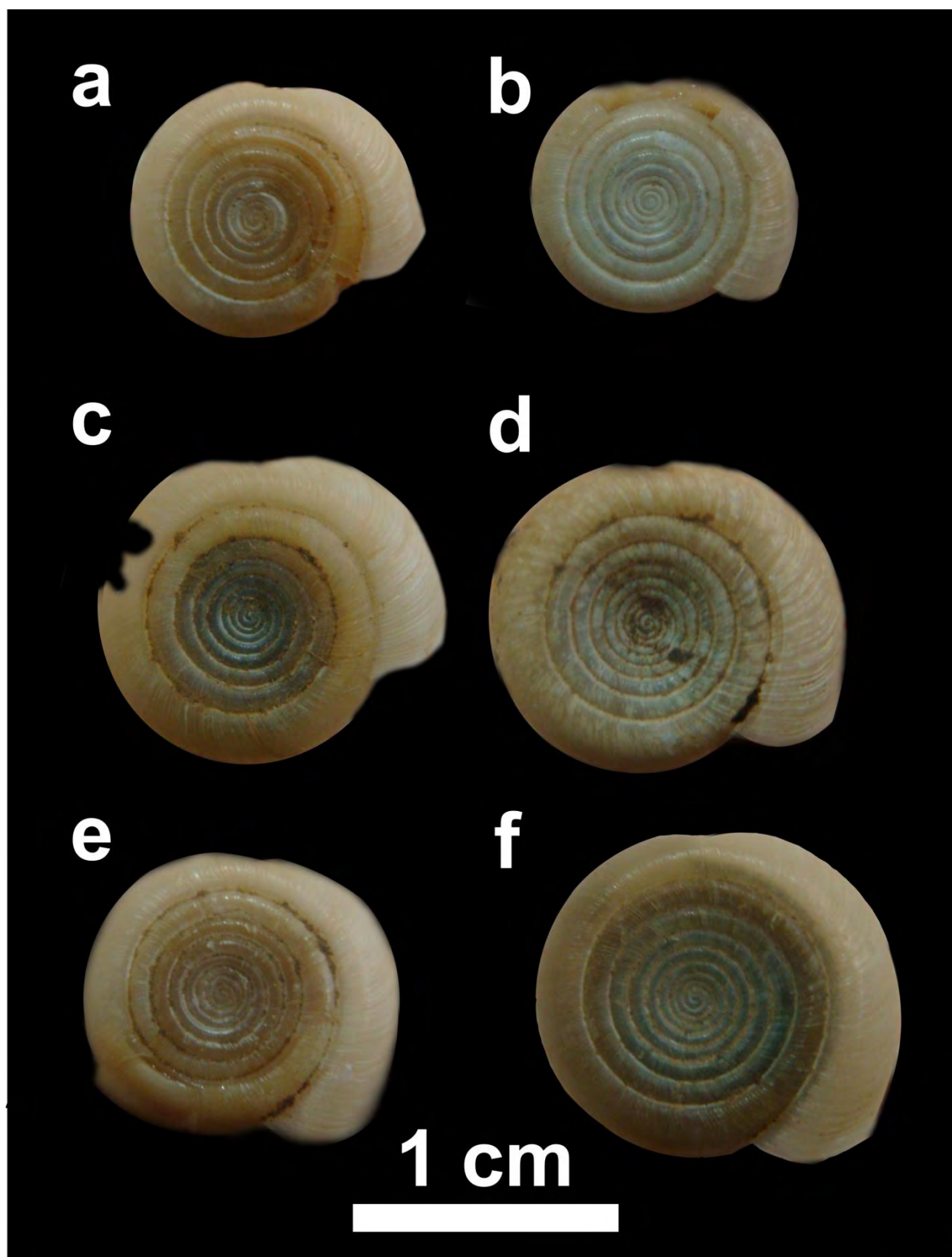
Los individuos de *S. helicycloides* son identificados a partir de la “muesca” o depresión en la última vuelta corporal (Fig. 5, Fig. 34). Todos los individuos estudiados presentaron esta depresión. Sin embargo, los resultados encontrados en el análisis filogenético revelan una gran diferencia genética entre los clados. ¿Esta diferencia implica la presencia de más de una especie dentro de *Systrophia helicycloides*?

La definición del concepto de especie es uno de los problemas más trascendentales y antiguos en las ciencias biológicas (Mayr, 1992). Si observamos los datos de distancias genéticas, encontradas observamos que éstas van desde 0% para secuencias de un mismo haplotipo hasta 10% para secuencias altamente divergentes del gen 16S rRNA; para el caso de COI los resultados son similares. Sin embargo, se ha criticado mucho que un simple valor de distancia genética pueda discriminar especies diferentes (Carpenter, 1992; Rubinoff *et al.*, 2006) por lo que se prefiere un análisis no sólo basado en distancias, sino en la observación de caracteres compartidos entre las secuencias (*sinapomorfias*) (De Salle *et al.*, 2005). Las secuencias pueden proveer una gran cantidad de sitios informativos y potenciar el análisis filogenético.

El concepto biológico de especie propone el aislamiento reproductivo como factor principal en el origen de las especies (Mayr, 1963). Sin embargo, el aislamiento geográfico de las poblaciones no permite una real evaluación del aislamiento reproductivo (conocer si en condiciones naturales estas poblaciones se cruzan entre sí, si tuvieran oportunidad de hacerlo). Por otro lado, el concepto evolutivo de especie (Simpson, 1961; Wiley, 1981), propone que una especie es un linaje que evoluciona separadamente de otros linajes, manteniendo su identidad, tendencias evolutivas y destino propio a través del tiempo.

Aún más desafiante que describir a una especie, es descubrir las causas que originan a las especies. Los moluscos terrestres, como otros invertebrados con baja capacidad de dispersión, tienen mucha probabilidad de sufrir especiación en contextos insulares debido al aislamiento poblacional (Huanga *et al.*, 2005). Sin embargo, el bosque amazónico es un sistema dinámico (Whitmore, 1998) que puede prevenir la aparición de contextos insulares y colaborar con la dispersión de las poblaciones.





**Figura 34.** Individuos de *Systrophia helicycloides* de los diferentes haplotipos encontrados: (a) S1, (b) S2, (c) S6, (d) S5, (e) S9, (f) S11.

Además, mayor evidencia para el proceso de especiación puede ser inferida mediante diferencias en el tracto genital que permitirían el aislamiento reproductivo, aunque se ha postulado que grandes diferencias morfométricas tampoco implican la incapacidad de reproducción (Van Riel *et al.*, 2003).

El análisis de secuencias de DNA nos puede dar información de diferencias no observables a partir del fenotipo, pudiendo sacar a la luz la presencia de especies crípticas, o resolver las relaciones evolutivas dentro de un complejo de especies (Dyer *et al.*, 2008).

Si bien el problema taxonómico va más allá del propósito de esta tesis, las grandes diferencias entre los linajes encontrados, deben ser evaluadas en un análisis específico más profundo, que incluya datos de morfología externa e interna, así como una evaluación de genes mitocondriales y nucleares.

#### **6.4 Poca vagilidad: Una espada de doble filo**

Generalmente, al estudiar filogenias intraespecíficas en moluscos se espera obtener un resultado que relacione la distribución de los haplotipos con sus diferencias genéticas, por ejemplo Pfenninger y Magnin (2001) observaron la presencia de dos clados de haplotipos altamente divergentes dentro de la especie *Candidula unifasciata*, siendo esta división concordante con diferencias morfológicas y de distribución geográfica, proponiendo la existencia de dos linajes evolutivos diferentes.

Sin embargo, la poca vagilidad asociada a los moluscos (Hugall *et al.*, 2002) que les permite aislamiento y diferenciación entre sus poblaciones, no les ayuda a escapar de las condiciones cambiantes de ambientes más dinámicos (como el bosque tropical) que modifican la distribución de sus poblaciones y provocan una mayor dispersión de los individuos. Así se podría explicar la presencia de haplotipos distribuidos en más de una localidad en Los Amigos o Inkaterra.

## 6.5 Estructuración geográfica de la diversidad genética

Para el análisis poblacional se optó por utilizar al marcador 16S rRNA debido a su mayor cantidad en proporción de sitios variables (ver Resultados). Dentro de las poblaciones de *S. helicycloides* se encontraron 11 haplotipos para las 46 secuencias estudiadas, la diversidad genética resultó moderadamente alta (0.813 - 81,3%). La diversidad genética puede ser explicada a partir de una característica en la estructura poblacional de los pulmonados: la presencia de “demos” o agrupamientos discontinuos dentro de las poblaciones de los moluscos (Thomaz *et al.*, 1996). Cuando el intercambio de individuos es reducido y se da entre demos próximos, se genera un patrón conocido como *stepping stone* (Kimura y Weiss, 1964). Esta estructura poblacional, aunada a la poca vagilidad, permite que los moluscos acumulen diferencias entre sus poblaciones. Es por esto que los valores altos de diversidad genética implican la aparición de alelos diferentes dentro de los demos que conforman a las poblaciones.

El análisis de *networks* resulta más fino para el estudio poblacional y muestra en detalle las diferencias entre los individuos de *S. helicycloides*. Dos haplotipos (S10 y S11 – linaje 3) se ubicaron a casi 40 mutaciones del grupo principal de secuencias. Dentro de este conjunto se observó una agrupación de haplotipos principalmente de la cuenca de los Amigos (linaje 2), y otro (linaje 1), que poseía la mayor cantidad de haplotipos (5) entre los cuales tenemos haplotipos restringidos a una sola cuenca (Los Amigos o Madre de Dios) como también distribuidos en ambas, este linaje mostró una topología en estrella (ver sección 6.6). La mayor diversidad genética ubicada en una parte más elevada de la cuenca (Los Amigos) con respecto a las partes más bajas, es contrastante con lo encontrado por Batista y Alves-Gomes (2006) para el pez *Brachyplatystoma rousseauxii*, quienes encontraron menor diversidad en la parte alta y mayor en la baja debido a las características migratorias de este pez.

La presencia de haplotipos que no parecen estar relacionados en el contexto geográfico como S7 (Palmereto), agrupado con el linaje 2 de haplotipos de Los Amigos, y S10 (CICRA), agrupado con haplotipos del Linaje 3, compuesto principalmente por individuos de Palmereto, podría indicar un error en el manejo de muestras. Sin embargo, la presencia de haplotipos ampliamente distribuidos a lo largo de la región (S1 y S5) provee sustento a la gran dispersión de los alelos mitocondriales dentro de ambas zonas.

Para corroborar la presencia de estos haplotipos en la población, se deberían observar un mayor número de muestras; aunque existen casos de haplotipos raros que han sido encontrados pocas veces dentro de una población. Por ejemplo, se cree que el haplotipo mitocondrial X de humanos se encuentra en poblaciones de Sudamérica, sin embargo Dornelles *et al.*, 2004 después de amplificar individuos de 25 poblaciones nativas de Sudamérica no encontraron ni un solo portador de ese haplotipo.

Por otro lado, el fenómeno conocido como “polimorfismo ancestral” podría provocar la ausencia de estructura geográfica de la diversidad genética de las poblaciones, dado que si los diferentes linajes han aparecido en tiempos evolutivos recientes, aún sus poblaciones diferenciadas podrían compartir variantes de alelos que no hayan sido afectados o fijados por la deriva génica (Brower, 1996). Éste podría ser el caso del individuo de Palmereto Pal29g que pertenece al haplotipo S7 (16S rRNA) y al C6 (COI), o al individuo de CICRA CloP20a de haplotipo S10 (16S rRNA) y C4 (COI).

En el caso del individuo de Palmereto, es el único individuo de esa localidad dentro del linaje 2, el cual está compuesto casi en su totalidad por haplotipos de Los Amigos. Lo contrario ocurre en el individuo de CICRA el cual está dentro del linaje 3 junto con haplotipos de Palmereto. Al realizar la filogenia con los marcadores concatenados las secuencias se agruparon según el orden esperado para los haplotipos de COI. Esto demuestra la necesidad de trabajar con varias regiones del genoma para obtener un mejor panorama de las relaciones evolutivas y conciliar la historia idiosincrática que nos revela cada gen (Hoelzer, 2006).

La presencia de haplotipos ampliamente distribuidos indica la poca estructura geográfica en la diversidad genética, al menos en el linaje 1. Estos haplotipos ampliamente distribuidos junto con la ocurrencia de haplotipos restringidos a ciertas zonas son un ejemplo real de la V categoría filogeográfica propuesta por Avise *et al.* (1987) para humanos y roedores.

## **6.6 Demografía histórica: Descubriendo el registro de la historia poblacional en las secuencias mitocondriales**

Avise (2000), analizando la diversidad genética ( $H$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) describe los posibles escenarios demográficos que resultan al comparar ambos valores: Poblaciones con una alta diversidad genética y nucleotídica son poblaciones estables de tamaño constante con un número efectivo alto. Poblaciones con baja diversidad nucleotídica y genética son poblaciones que han experimentado un cuello de botella genético prolongado o severo. Una alta diversidad genética y una baja diversidad nucleotídica sugieren el rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral de pocos individuos, el bajo número efectivo en la población ancestral puede haber sido causado por un cuello de botella genético; sin embargo, la población es capaz de crecer recuperando diversidad genética vía acumulación de pocas mutaciones. Un bajo valor de diversidad genética junto con una alta diversidad nucleotídica es el resultado de un cuello de botella que elimina a varios haplotipos, lo que no repercute directamente en la diversidad nucleotídica.

Es posible observar que la topología en los árboles no se resuelve bien hacia los extremos de las ramas (Fig. 10), debido a la presencia de pocas mutaciones entre los haplotipos dentro de cada linaje, en especial del linaje 1 (Fig. 14). Esta topología se conoce como “árbol en estrella” (Avise, 2000), y también es una señal de que pudo haber existido un evento de cuello de botella genético inmediatamente seguido de una expansión súbita.

Utilizando la información presentada se puede inferir en nuestros datos la historia demográfica en las poblaciones de *S. helicycloides*: Los valores altos de diversidad genética y menores de diversidad nucleotídica corresponderían al caso

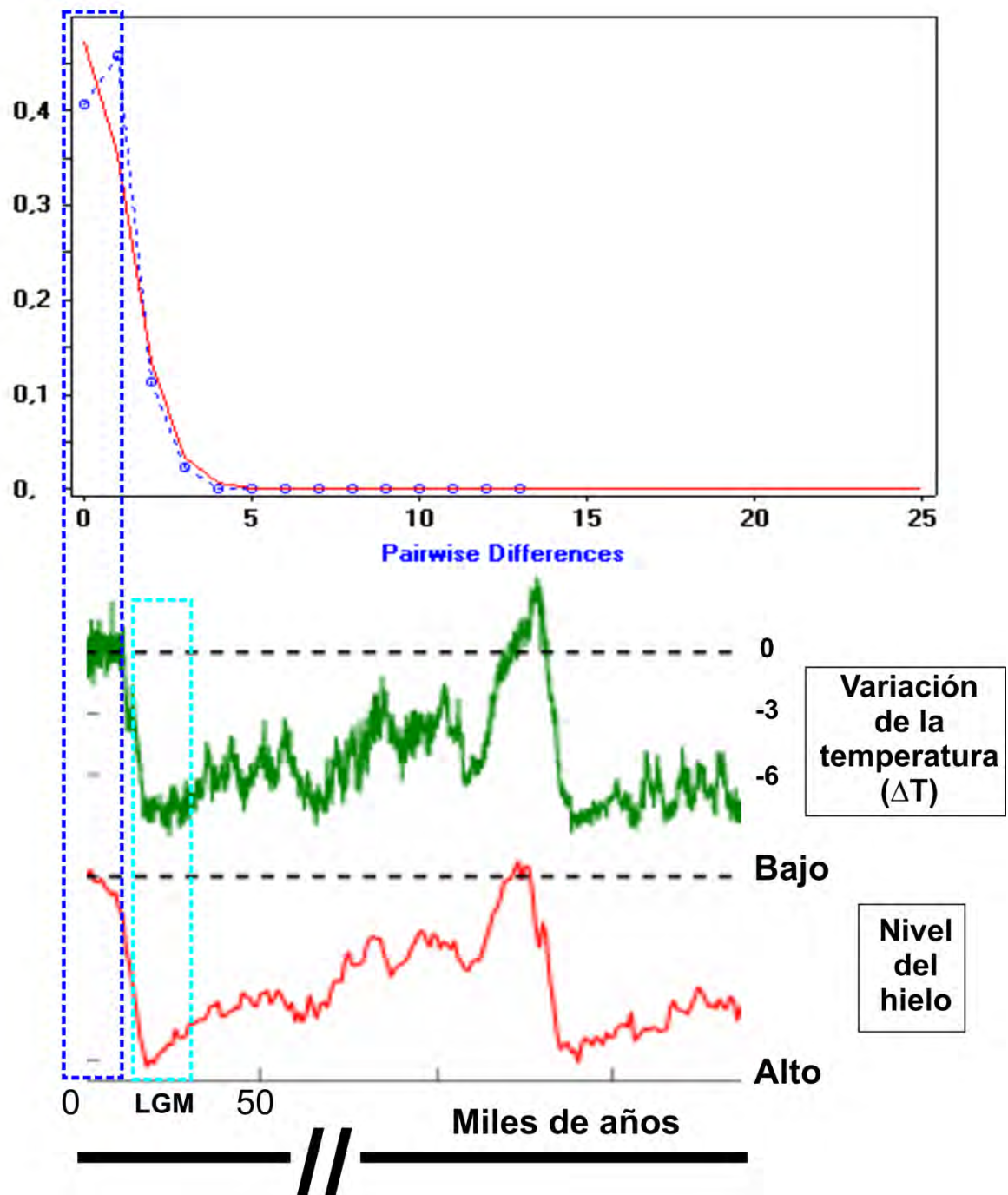
de expansión poblacional súbita luego de un cuello de botella genético, aunque la presencia de una diversidad nucleotídica mayor al 1% podría indicar la ocurrencia de zonas de contacto secundario entre las poblaciones (Grant y Bowen, 1998).

Rogers y Harpending (1992) demostraron que los eventos de expansión poblacional quedan grabados en la estructura genética de las poblaciones. Si la población ha sido estable a lo largo del tiempo entonces presentará una curva de tipo multimodal al comparar las diferencias a pares, con diferentes haplotipos con similar frecuencia. Al contrario, si la población sufrió un cuello de botella seguido de una expansión poblacional súbita, ésta presentará una curva unimodal debido a la gran frecuencia de haplotipos con pocas diferencias entre sí al derivar de un solo haplotipo ancestral.

Las diferencias a pares dentro de las poblaciones evidencian cierto rasgo de expansión poblacional luego de un evento de "cuello de botella" genético (*bottleneck*) principalmente en el linaje 1 (Haplotipos: S1 – S5). Una mayor frecuencia de haplotipos con pocas diferencias es consistente con la topología en estrella encontrada en los *networks* para estas poblaciones. El estadístico  $F_s$  de Fu también presentó el valor más negativo (pero no significativo) para el linaje 1, lo que puede significar un rastro de expansión poblacional (Fu, 1997).

Si tomamos el punto más alto de la curva de la *mismatch distribution* para el caso del Linaje 1, este valor se conoce como  $\tau$  (ver sección 4.13), siendo que  $\tau = 2ut$ . Como conocemos el valor de  $\tau$  (0,752 según el DNAsp) y de la tasa de mutación  $u$  ( $3,66 \times 10^{-5}$ ), podemos estimar un tiempo desde la última expansión poblacional de hace unos 10 – 15 mil años atrás, lo cual coincide con un aumento de las temperaturas y el descenso del nivel del hielo (Petit *et al.*, 1999) (Fig. 34).

El último máximo glacial (LGM: *Last Glacial Maximum*) ocurrió hace unos 20 – 25 mil años (Zemlak *et al.*, 2008), y corresponde al último periodo donde los glaciares alcanzaron su mayor extensión. Esto puede haber provocado la disminución y fragmentación de la población. Luego de este periodo, el aumento de la temperatura y de la distribución de la vegetación podría haber beneficiado la expansión poblacional del linaje 1.



**Figura 35.** Comparación del posible evento de expansión poblacional del Linaje 1 (16S rRNA) con las condiciones climáticas presentes hace 10 mil años (línea azul). LGM es el periodo correspondiente al último máximo glacial (hace 20 000 años aprox., línea celeste). Modificado de Petit *et al.*, (1999).

## 6.7 Los cambios históricos y su efecto en la estructura genética

La estructura genética de las especies está modelada por los procesos geológicos, climáticos históricos y puede ser evidenciada mediante análisis filogenéticos de las secuencias de DNA (Avice, 2000). En el Neotrópico la diferenciación ha sido relacionada con eventos tectónicos y climáticos (Rull, 2006; Neiman y Lively, 2004). Los cambios ocurridos pueden provocar la estructuración de la diversidad genética dentro de las especies (Hewitt, 2004), sobre todo las que poseen poblaciones sensibles a las condiciones ambientales (Hurt, 2004).

¿Qué cambios ocurrieron en el bosque amazónico en estos últimos millones de años?. La historia de la región registra incursiones marinas, formación de grandes lagos y los últimos rezagos de la orogénesis de los Andes. ¿Estos factores moldearon la diversidad presente, o existe otra explicación?

Existen pruebas de la presencia de un lago interior en la Amazonia occidental (Frailey *et al.*, 1988) durante el Pleistoceno que apareció debido a incursiones marinas. Este gran lago podría haber tenido efecto en la dispersión pasiva de los moluscos. Sin embargo, estudios recientes datan al paleo-lago no en el Pleistoceno, sino en el Mioceno (Wesselingh y Salo, 2006). Las estimativas tanto del tiempo de divergencia como del ancestro común más reciente en las secuencias de *S. helicycloides* resultan en un tiempo de aproximadamente un millón de años, descartando la influencia de incursiones marinas o paleo-lagos en la distribución de los haplotipos. Este resultado es similar a lo encontrado por Solomon *et al.* (2008) para varias especies de hormigas del género *Atta*.

Una de las hipótesis para explicar la gran diversidad en la Amazonia corresponde a los refugios pleistocénicos (Haffer, 1969). Esta hipótesis propone que los cambios climáticos pasados produjeron la contracción de los bosques amazónicos, aislando a las poblaciones y provocando la especiación. Luego, un nuevo cambio en las condiciones climáticas produce el avance de los bosques y el aumento en rango de distribución de poblaciones o especies nuevas. Estos cambios en las condiciones climáticas podrían actuar como cuellos de botella



genéticos y la posterior mejora de las condiciones provocaría una nueva expansión poblacional y del rango de distribución.

La hipótesis de los refugios ha sido criticada, sobre todo porque varios taxa no presentan patrones de expansión asociada a los cambios climáticos en el Pleistoceno, que a su vez no habrían tenido un efecto sobre la estabilidad del bosque amazónico, la Amazonia se ha mantenido estable durante las glaciaciones (Lessa *et al.*, 2003). Se ha sugerido que el último ciclo glacial afectó la composición de los bosques más que su distribución (Colinvaux y De Oliveira, 2001).

La cordillera de los Andes puede haber tenido influencia provocando el aislamiento entre poblaciones y convirtiéndose en una barrera al flujo génico (Ruzzante *et al.*, 2006). Si bien la aparición de los Andes se dio en el Mioceno, la continua interacción entre la placa de Nazca y la placa Sudamericana ejerce su efecto modificando el paisaje en la Amazonia occidental. La última gran fase tectónica ocurrió de 1 - 5 millones de años atrás y condujo a la formación del Arco de Fitzcarrald hace un millón de años (Lundberg *et al.*, 1998). La aparición del arco puede haber actuado como barrera al flujo génico: Salcedo (2007) encontró que a pesar de las pocas diferencias morfológicas en la especie *Chaetostoma lineopunctatum* existían diferencias genéticas entre las poblaciones que se ubicaban en las cuencas a ambos extremos del Arco de Fitzcarrald, además el tiempo de divergencia entre estas poblaciones coincidió con la aparición del Arco.

El rol del último levantamiento de los Andes también es comentado por Ramírez *et al.*, 2008, quienes reportan tiempos de divergencia de entre 1 a 5 millones de años para varias especies del díptero *Rhagoletis*. El último periodo tectónico puede haber generado barreras pero también desaparecido algunas ya existentes, además de provocar cambios en el tamaño y dirección de las cuencas (Ruzzante *et al.*, 2006).

Es posible entonces que este periodo haya tenido un efecto sobre las poblaciones de *S. helicycloides*, ya sea incentivando la divergencia entre los clados del molusco o permitiendo la dispersión de las poblaciones al modificar la dirección de las cuencas.

## **6.8 La dinámica actual en el bosque tropical**

La aparición de barreras implica una separación de las poblaciones, entonces debe existir otro mecanismo que influya en la redistribución de la especie, un mecanismo menos ligado a los efectos históricos y más a los cambios continuos y dinámicos que se dan en el bosque tropical.

En las regiones fluviales, los ríos tienen una influencia directa sobre la distribución de especies y hábitats, y sobre los procesos de dispersión, sucesión y especiación, los ríos pueden actuar tanto como rutas de dispersión como barreras al flujo génico (Toivonen *et al.*, 2007)

Los ríos amazónicos, sobre todo los más caudalosos, han sido propuestos como barreras a la dispersión de las especies (Hayes y Sewlal, 2004), modificando además el paisaje dentro de los refugios pleistocénicos (Kalliola *et al.*, 1987). Los cambios provocados por la dinámica de los ríos pueden ser responsables de la alta diversidad biológica en la Amazonia, debido a la generación de mosaicos de bosques y suelos que crean a su vez mosaicos de hábitats a pequeña escala. La dinámica de los ríos también causa la formación, desaparición o reaparición de nuevos puntos de contacto para las poblaciones de una especie. Estos cambios rápidos permiten la competencia y adaptación al hábitat en tiempos cortos (Salo *et al.*, 1986). Se ha estimado que los cambios provocados por los ríos puede modificar el paisaje en forma rápida, la erosión de los ríos regenera los bosques en un área de 200 a 400 km<sup>2</sup> anualmente, durante 100 años se podría modificar casi el 5% del área de las selvas peruanas (Kalliola *et al.*, 1987)

Sin embargo, el estudio realizado por Gascon *et al.* (2000) sobre los patrones de distribución de especies de anfibios y mamíferos pequeños en las márgenes del Río Juruá en la Amazonia brasilera, debilita la hipótesis de ríos como barreras al flujo y propone que los patrones de distribución son modelados principalmente por el tipo de hábitat, el aislamiento por distancia y el impacto de la orogénesis de los Andes. Esta hipótesis también fue evaluada por Loughheed *et al.* (1999) quienes desestiman a los ríos como barreras al flujo, y otorgan mayor preponderancia a barreras históricas no presentes actualmente en el paisaje.

La hipótesis de los ríos como barreras encuentra problemas en las especies que ocupan las zonas inundadas durante la temporada de lluvia (como es el caso de *Systrophia*, ver Fig. 3; Ramírez *com. per.*), las cuales pueden ser potencialmente redistribuidas (vía dispersión pasiva) con los linajes de las riberas opuestas debido a los cambios de posición de los meandros.

Haffer (2008) apunta que un número representativo de taxa que habitan regiones ocupadas por ríos permanecen indiferenciados morfológicamente, y comenta que los ríos podrían haber tenido un efecto reducido sobre todo en épocas de seca y durante los periodos de un descenso en el nivel del mar que ocurrieron en el Pleistoceno. Si bien, el río puede funcionar como barrera en las zonas de mayor caudal, el efecto no sería el mismo cerca a los orígenes del río o en zonas donde el caudal sea menor. Loughheed *et al.* (1999) también demostraron que la diferenciación de las poblaciones ribereñas amazónicas no se da entre sus márgenes sino principalmente en un eje entre las regiones donde comienza el río (cabecera) y la parte final. Esta forma de diferenciación implica el aislamiento por distancia, y la generación de una gradiente de diferenciación (Moritz *et al.*, 2000).

La diferenciación entre las poblaciones mediante el estadístico  $\phi_{st}$  nos muestra que existe ligera diferenciación entre las cuencas estudiadas. El resultado de  $\phi_{st}$  obtenido al comparar la región de Los Amigos contra la región de Inkaterri (0,16; y que sobrepasa el valor de 0,2 en las comparaciones por localidad CICRA, CM1 contra Gamitana, Concepción) podría ajustarse a la hipótesis formulada por Loughheed *et al.* (1999).

Los valores negativos encontrados pueden significar una mayor heterocigosidad (ocurrencia de varios alelos diferentes) dentro de las localidades (Shulzitski *et al.*, 2009). La baja diferenciación se puede deber a la presencia de flujo génico histórico entre las poblaciones (Wright, 1965; Excoffier *et al.*, 1992). Nuevamente, el ambiente dinámico del bosque tropical puede haber influenciado, colaborando con el flujo génico entre las poblaciones del molusco.

Por otro lado, el grado de diferenciación entre las poblaciones no sólo depende del aislamiento reproductivo, sino también es influenciado por procesos evolutivos como la selección natural, la deriva génica, la tasa de mutación y el tiempo de aislamiento. A pesar de existir una alta variabilidad dentro de poblaciones geográficamente aisladas, el establecimiento de divergencias suele ser complejo, porque la estructura social y geográfica así como el tamaño de la población reproductiva pueden afectar el tiempo de diversificación genética de los linajes manteniendo la homogeneidad entre poblaciones (Hoetzel, 1998).

## **6.9 El reflejo de la dinámica del bosque tropical en los genes mitocondriales de los moluscos terrestres**

Si la reducida habilidad de dispersión de los moluscos no les permite escapar a las condiciones cambiantes entonces es posible que en sus patrones de estructura y diversidad genética queden registrados estos cambios.

Romero (2008), utilizando a *Bostryx scalariformis* (Gastropoda, Orthalicidae), un molusco terrestre adaptado a la costa desértica del Perú, encontró que en un rango de 100 km existía una fuerte estructura genética de las poblaciones debido al aislamiento geográfico provocado por el desierto costero, esto coincidió con la diferenciación morfológica entre las poblaciones y la ausencia del flujo génico entre los morfotipos encontrados. La expansión de las poblaciones en el desierto costero se relaciona con el incremento de la temperatura y del rango de la vegetación asociados con el Fenómeno El Niño / Oscilación Sur (Ramírez, 2004; Romero, 2008).

Los datos del molusco muestran la presencia de linajes divergentes restringidos o distribuidos en las cuencas estudiadas. ¿Qué tipo de cambios reflejan estas diferencias, son parte de la dinámica actual del bosque o de eventos históricos que produjeron cambios más dramáticos?.

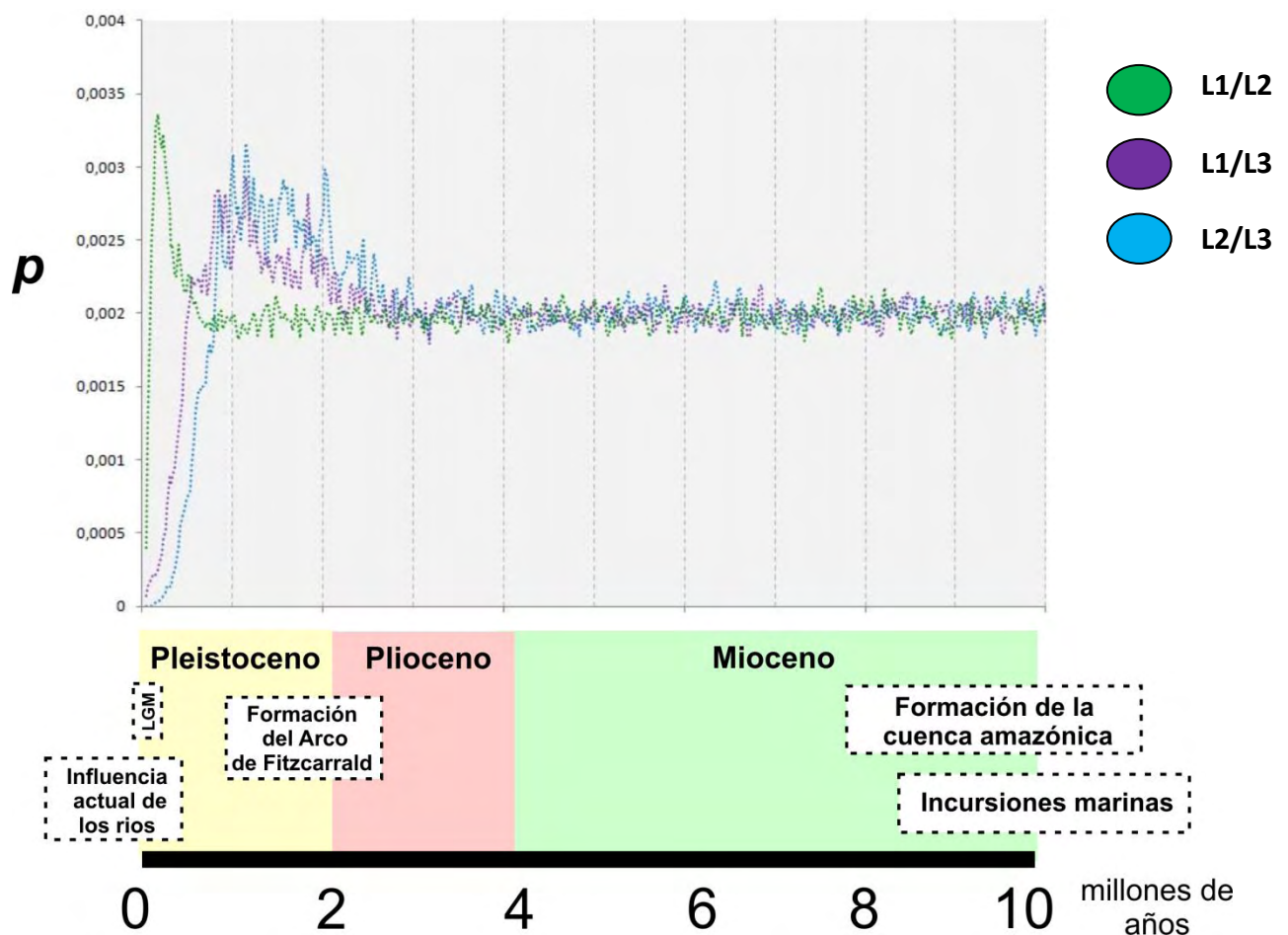
La historia de la población y los factores ecológicos y demográficos actuales determinan la cantidad de variación genética y el grado de diferenciación entre las poblaciones. Sin embargo, separar los efectos de los cambios históricos y recientes sobre los patrones de diversidad genética es una tarea complicada (Matocq *et al.*, 2000).

Se han presentado varias hipótesis sobre los diferentes escenarios que podrían haber ocurrido en los últimos millones de años (Fig. 35). Antes de la aparición de los Andes, los sistrófidos ya se encontraban habitando esta región (Ramírez, 1993), por lo que sus patrones de estructura genético poblacional deben haber sido influenciados primero por este evento. La mayor divergencia encontrada entre los linajes data de hace un millón de años coincidiendo con la última fase del levantamiento de los Andes.

Sin embargo la divergencia entre los linajes 1 y 2 ocurrió hace 200 mil años aproximadamente, por lo que parece que en tiempos más recientes son los cambios climáticos los que producen el aislamiento y la expansión de las poblaciones.

Los ríos amazónicos se convierten en una vía de dispersión, una manera de romper las barreras establecidas y de redistribuir los alelos existentes dentro de una población, pero que a su vez no enmascaran el patrón genético presente en los moluscos, siendo posible reconocer a los linajes diferentes. Este es un resultado similar a lo encontrado por Patton *et al.* (1994) para roedores pequeños en el cual se descubrió la presencia de linajes distribuidos y restringidos a lo largo del río Juruá, sugiriendo que la divergencia es antigua y que el patrón actual es resultado de una dispersión reciente de los linajes a lo largo de la cuenca del río.

La ausencia de flujo génico entre los linajes a pesar de que algunos se encuentran actualmente en simpatria (linajes diferentes ocupando una misma localidad) implica la importancia de los ríos en la dispersión. Sin embargo, el cambio constante de sus cursos disminuye su efecto sobre la diferenciación de las poblaciones de *S. helicycloides*.



**Figura 36.** Divergencia entre los linajes de *S. helicycloides* comparada con los cambios geológicos y climáticos ocurridos durante los últimos 10 millones de años. Los datos de divergencia entre linajes: L1/L2 (verde), L1/L3 (morado), L2/L3 (celeste) fueron hallados con MDIV,  $p$ =probabilidad posterior. La datación de los eventos se obtuvo a partir de la literatura: Incurciones marinas (Lovejoy *et al.*, 2006; Wesselingh y Salo, 2006), formación de la cuenca amazónica (Torrico *et al.*, 2009; Rigsby *et al.*, 2009), formación del Arco de Fitzcarrald (Salcedo, 2007), último máximo glacial (Ruzzante *et al.*, 2006) e influencia de los ríos (Kalliola *et al.*, 1987).

Por lo tanto, la dinámica actual de los ríos tiene un menor efecto que la dinámica histórica del bosque amazónico sobre el modelamiento de la arquitectura genética de las poblaciones de moluscos terrestres.

La información presente en el genoma es información digital, codificada por cuatro bases y replicada eficientemente a lo largo de las generaciones (Dawkins, 1995). Estudiando esta inmensa fuente de información se podría reconocer las respuestas demográficas a los cambios pasados y actuales (Lessa *et al.*, 2003). En particular, el genoma mitocondrial de los moluscos terrestres ha mostrado ser un banco de datos donde se pueden registrar los cambios históricos y recientes. Por ello, el análisis filogeográfico de moluscos terrestres se convierte en una nueva aproximación para descifrar los orígenes de la diversidad amazónica.

## **6.9 Barcoding**

Las secuencias de COI de *Systrophia helicycloides* presentaron una divergencia mayor al 5%, todas las secuencias conformaron un clado monofilético separado de la secuencia de *Wayampia* sp. Si bien existe gran variación entre las secuencias COI, estas no tienen un alto porcentaje de similitud (>95%) con ninguna otra secuencia dentro de la base de datos del BOLD, demostrando el vacío de información para Scolodontidae y familias evolutivamente cercanas.

A pesar de la gran variación entre las secuencias del DNA mitocondrial en los moluscos, Davidson *et al.* (2009) propusieron que el COI podría ser de utilidad en la discriminación de los grupos dentro de Stylommatophora. En este trabajo también se propuso cambiar el valor de 2% asignado por Hebert *et al.* (2003) por 4%. Aún utilizando este valor, las diferencias entre las secuencias de *Systrophia* resultan mayores a lo esperado para la comparación intraespecífica.

El límite de 4% posee una probabilidad de error de identificación de entre 32% y 44% (Davidson *et al.*, 2009) por lo que la aplicación del código de barras de DNA en moluscos precisa aún de una gran ayuda de la taxonomía convencional.

El establecimiento de este límite se realizó a partir del estudio de menos de 1000 secuencias. Siendo Mollusca el segundo *phylum* más diverso (Lydeard *et al.*, 2004), resulta evidente que se necesita un análisis más profundo para determinar los límites de divergencia entre las secuencias, así como una mayor cantidad de secuencias disponibles en las bases de datos. Lo contrario sucede con los taxa de vertebrados (Hebert *et al.*, 2004) que poseen más registros dentro de *Genbank* o BOLD y que a su vez presentan una mayor homogeneidad dentro de sus secuencias COI, lo que permite una asignación de límite de divergencia intraespecífica más confiable.

## **6.7 Conservación**

El conocimiento de la estructuración genética contribuye enormemente en el entendimiento del origen y los límites de las especies. El enfoque de la conservación de las especies está siendo modificado para conservar poblaciones geográficamente divergentes y genéticamente diferenciadas con una historia evolutiva en común (Mata, 2005).

Particularmente en situaciones donde es necesaria la decisión del esfuerzo de conservación entre varias poblaciones, la información concerniente a la variación genética puede ser un buen criterio para guiar esta elección (Holland y Haldfield, 2002), por lo que el conocimiento de la estructura filogeográfica de las poblaciones fragmentadas es vital para la formulación de estrategias de conservación. El manejo efectivo de especies amenazadas requiere de información confiable del hábitat, estructura poblacional y las relaciones taxonómicas. Los esfuerzos de manejo deben mantener la máxima diversidad genética preservando todas las poblaciones posibles, particularmente las que poseen haplotipos altamente divergentes.

Las Unidades Evolutivamente Significantes (ESU) son poblaciones de organismos que son consideradas distintas para propósitos de conservación (Moritz, 1994). El término puede ser aplicado a especies, subespecies, razas geográficas o poblaciones. La definición de ESU's sigue los siguientes criterios: (1) Separación geográfica, (2) diferenciación genética usando marcadores neutros, causada por la restricción de flujo génico y (3) adaptaciones fenotípicas locales.



La filogenia intraespecífica y la red de haplotipos muestran claramente la presencia de tres linajes diferentes dentro de *S. helicycloides*, estos están algo restringidos a una zona (linaje 2 o 3) o ampliamente distribuidos (linaje 1). Si bien existen diferencias genéticas, los linajes se encuentran en la actualidad ocupando localidades similares. La presencia de una distribución simpátrica (linajes compartiendo una misma distribución) no deslinda eventos vicariantes pasados que permitieron la divergencia y aparición de los linajes.

¿Hacia dónde dedicar los esfuerzos de conservación? Según Mata (2005) debería ser a conservar los haplotipos divergentes. Sin embargo, en vez de pensar a cada localidad como una población aislada, debemos tomar en cuenta que la dinámica de los ríos puede minimizar el efecto de la distancia y permitir que un conjunto de individuos de la misma especie antes aislados puedan localizarse cercanamente de otros miembros del grupo para aparearse (Waples y Gaggiotti, 2006). Si aplicamos el enfoque a partir de los linajes, tanto Los Amigos como Inkaterra tienen las mismas prioridades de conservación. Recuérdese que estas áreas, que ahora son zonas de conservación han sufrido algún tipo de impacto por poblaciones humanas, principalmente por causa de la minería.

Los problemas en la Amazonia se deben a la constante degradación de hábitats por la deforestación, expansión agrícola y ganadera, construcción de carreteras y principalmente la actividad minera que destruyen el corazón del bosque tropical (Soares-Filho *et al.*, 2006) (ver Fig. 1), de ahí la importancia de concesiones de conservación que permitan la preservación del hábitat y a la vez, la investigación del ecosistema

La conservación de estas áreas de diversidad permitirá recopilar más información sobre las distribuciones actuales e históricas de los diferentes taxa de la región más diversa del planeta. El estudio del rol de los cambios climáticos y geológicos y su relación con la diversificación en los bosques tropicales cobra mayor importancia en estos tiempos para predecir los futuros efectos de un posible cambio climático.

## 7. CONCLUSIONES

1. El análisis de diversidad genética y de filogenia de los haplotipos de la región estudiada (cuenca de Los Amigos y cuenca del Bajo Madre de Dios) muestra la presencia de tres linajes diferentes dentro de *Systrophia helicycloides*.
2. Un grupo de haplotipos (linaje 3) presenta una gran divergencia con respecto a los demás, estas diferencias contribuyen a elevar la diversidad genética en las poblaciones.
3. El linaje 1 se distribuye a lo largo de las cuencas de Los Amigos y del Bajo Madre Dios, mientras que los linajes 2 y 3 se encuentran esencialmente restringidos a una sola cuenca. Este patrón revela una leve estructuración geográfica de la diversidad genética en las poblaciones.
4. La estructura genética actual en las poblaciones estudiadas habría sido provocada por la dinámica en el bosque tropical:
  - a. Los cambios geológicos (orogénesis) habrían producido la diferenciación entre los linajes encontrados.
  - b. La dinámica actual representada por los ríos amazónicos puede haber influenciado la distribución de la diversidad genética, sin opacar los efectos históricos.
5. El genoma mitocondrial de los moluscos terrestres puede ser un buen registro de los cambios biogeográficos ocurridos en la cuenca de los ríos Los Amigos y Bajo Madre de Dios, demostrando que el análisis filogeográfico en moluscos terrestres puede convertirse en una nueva herramienta para descifrar los orígenes de la diversidad amazónica.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avise, J.; J. Arnold; R. Ball; E. Bermingham; T. Lamb; J. Neigel; C. Reeb; N. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J. 1996. Toward a regional conservation genetics perspective: Phylogeography of faunas in the Southern United States. pp. 431-470. In: Avise, J.; L. Hamrick (eds.): *Conservation genetics. Case history from nature*. Chapman & Hall. New York.
- Avise, J. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise, J. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2 ed. Chapman & Hall, New York.
- Baker, H. 1925. Agnathomorphous Aulacopoda. *Nautilus* 38: 86–89.
- Bandelt, H.; P. Forster; A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barthem, R.; M. Goulding; B. Forsberg; C. Cañas; H. Ortega. 2003. Aquatic ecology of the Río Madre de Dios: Scientific bases for Andes-Amazon headwaters conservation. *Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica/Amazon Conservation Association*, Lima. 117 p.
- Batalha-Filho, H. 2008. Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa.

- Batista, J.; J. Alves-Gomes. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research* 5 (4): 723-740
- Bensasson, D.; D. Zhang; D. Hartl; G. Hewitt. 2001. Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 314–321.
- Boss, K. 1982. Mollusca, p. 945-1166. In: S.P. Parker (Ed.). *Synopsis and classification of living organisms*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1232 p.
- Britton G.; A. Islam; Y. Xuan; K. Sathasivan. 2007. Procedure to Identify and Submit cDNA Sequences to *Genbank*. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 17(2): 161-172.
- Brower A. 1996. Parallel race formation and evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: A phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50 (1): 195-221.
- Campbell, N.; S. Barker. 1999. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: Fivefold tandem repetition of a coding region. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 732-740.
- Carpenter 1992. Distances, assumptions and social wasps. *Cladistics* 8: 155-160.
- Chiba, S. 1999. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin Islands. *Evolution* 53: 460-471.
- Chumbe, A. 2009. Evolución del complejo de especies *Bostryx modestus* basado en el gen de la citocromo C Oxidasa subunidad I del genoma mitocondrial. Tesis de Bachiller en Genética y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Colinvaux, P.; P. De Oliveira. 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 166: 51-63.
- Convention of Biological Diversity. 1992. Convenio sobre Diversidad biológica. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Congrains, C. 2010. Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código de barras de DNA de *Megalobulimus capillaceus* (Mollusca, Gastropoda). Tesis para optar el Título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Congreso de la República del Perú. 1993. Constitución Política del Perú. Disponible *online* en [www.congreso.gob.pe/constitucion.htm](http://www.congreso.gob.pe/constitucion.htm).
- Davidson, A.; R. Blackie; G. Scothern. 2009. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Molecular Ecology Resources* 9: 1092–1101.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. Disponible en [http://academic.umfk.maine.edu/jbecker/Origin\\_of\\_Species.pdf](http://academic.umfk.maine.edu/jbecker/Origin_of_Species.pdf)
- Dawkins, R. 1995. River out of Eden. Weindeinfeld and Nicholson. London. 166p.
- DeSalle, R.; M. Egan; M. Siddall. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2360 (1462): 1905-1916.
- Döring, A., 1875. Apuntes sobre la Fauna de Moluscos de la República Argentina (segunda parte). *Bol. Acad. Nac. Cienc. Exact. Univ. Córdoba* 1: 432–460.
- Drummond A.; A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214

- Dornelles, C.; S. Bonatto; L. de Freitas; F. Salzano. 2004. Is haplogroup X present in extant South American Indians?. 127 (4): 439 – 448.
- Dyer N.; S. Lawton; S. Ravel; K. Choi; M. Lehane; A. Robinson; L. Okedi; M. Hall; P. Solano; M. Donnelly. 2008. Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S, ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the palpalis group. *Mol Phylogenet Evol.* 49 (1): 227-239.
- Erwin, T. 1990. Natural history of the carabid beetles at the BIOLAT Biological Station, Rio Manu, Pakitza, Peru. *Revista Peruana de Entomología* 33: 1-85.
- Excoffier, L.; P. Smouse; J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–494
- Excoffier, L.; G.Laval; S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Folmer, O. ; M. Black; W. Hoeh; R. Lutz ; R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(5): 294-299.
- Frailey, C.; E. Lavina; A. Rancy; J. Filho. 1988. A proposed pleistocene/holocene lake in the amazon basin and its significance to Amazonian geology and biogeography. *Acta Amazonica* 18 (3-4): 119-143.

- Frey, J.E.; B. Frey 2004. Origin of intra-individual variation in PCR-amplified mitochondrial cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): Mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration? *Hereditas* 140: 92–98.
- Fu, Y. 1997. Statistical neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Gascon, C.; J. Malcolm; J. Patton; M. da Silva; J. Bogarti; S. Loughheed; C. Peres; S. Neckel; P. Boag. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *PNAS* 97 (25): 13672–13677.
- Goulding, M.; C. Cañas; R. Barthem; B. Forsberg; H. Ortega. 2003. Amazon headwaters: Rivers, wildlife, and conservation in southeastern Peru. Gráfica Biblos S.A.
- Grant, W.; B. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89 (5): 415-426.
- Gray, M.; G. Burger; B. Lang. 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283:1476-1481.
- Goodacre, S. 2001. Genetic variation in a Pacific Island land snail: population history versus current drift and selection. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 121-126.
- Gutell R; N. Larsen; C. Woese. 1994. Lessons from an Evolving Ribosomal RNA: 16S and 23S rRNA Structure from a Comparative Perspective. *Microbiological Reviews* 58 (1): 10-26.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazon forest birds. *Science* 165: 131–137.

- Haffer, J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz. J. Biol.*, 68(4, Suppl.): 917-947.
- Haszprunar, G. 1985. The Heterobranchia — a new concept of the phylogeny of the higher Gastropoda. *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 23 (1): 15–37.
- Hatzoglou, E.; G. Rodakis; R. Lecanidou. 1995. Complete Sequence and Gene Organization of the Mitochondrial Genome of the Land Snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 140: 1353-1366.
- Hausdorf, B.; P. Bouchet. 2005. Working classification of the Gastropoda. Pulmonata, p. 263-283. In: P. Bouchet & J.P. Rocroi (eds.), *Classification and nomenclator of gastropod families*. *Malacologia* 47 (1/2): 1-397.
- Hausdorf, B. 2006. The systematic position of Scolodonta Döring, 1875 and Scolodontidae H. B. Baker, 1925 (Gastropoda: Pulmonata). *Zoologischer Anzeiger* 245 (3-4): 161-165.
- Hayes, F.; J. Sewlal. 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31 1809-1818.
- Hebert, P.; A. Cywinska; S. Ball; J. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal. Soc. Lond.* 270: 313-322.
- Hebert, P.; M. Stoeckle; T. Zemlak & C. Francis. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *Plos Biology*, 2 (10): e312.
- Hewitt, G. 2004. The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1: 4.



- Hoelzer, G. 2006. Self-Organization of Population Structure in Biological Systems. *In: Unifying Themes in Complex Systems. New Research Volume IIIB* Proceedings from the Third International Conference on Complex Systems. p 73-79. Springer Berlin Heidelberg.
- Hoetzel, A. 1998. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: Implications for conservation policy. *J. Heredity*, 89 (5): 451–458.
- Holland, B.; M. Hadfield. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology* 11: 365-375.
- Huang, X.; A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.
- Huanga, Z.; N. Liua; T. Zhoub; B. Ju. 2005. Effects of environmental factors on the population genetic structure in chukar partridge (*Alectoris chukar*). *Journal of Arid Environments* 62: 427–434.
- Huelsenbeck J.; Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8):754-755.
- Hugall, A.; C. Moritz; A. Moussalli; J. Stanisic. 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *PNAS* 99: 6112-6117.
- Hurt, C. 2004. Genetic divergence, population structure and historical demography of rare springsnails (*Pyrgulopsis*) in the lower Colorado River basin. *Molecular Ecology* 13: 1173–1187.
- Ituarte, C.; G. Cuezco; Ramírez, R. 2008 Inventario preliminar de los moluscos terrestres y de agua dulce del área de la Reserva Los Amigos. Disponible en [www.amazonconservation.org](http://www.amazonconservation.org).

- Kalliola, R.; J. Salo; Y. Mäkinen. 1987. Regeneración natural de selvas en la amazonia peruana 1: Dinámica fluvial y sucesión ribereña. Memorias del Museo de Historia Natural 18. 102 p.
- Ketmaier, V.; F. Giusti; A. Caccone. 2006. Molecular phylogeny and historical biogeography of the land snail genus *Solatopupa* (Pulmonata) in the peri-Tyrrhenian area. Mol. Phylogenet. Evol. 39(2): 439-351.
- Kimura, M.; E. Weiss. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. Genetics 49: 561-576.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111–120.
- Kurabayashi, A.; R. Ueshima. 2000. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematics implication of the genome organization. Mol. Biol. Evol. 17:266-277.
- Lanave C; G. Preparata; C. Saccone; G. Serio. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. J. Mol. Evol. 20(1): 86-93.
- Larkin, M.; G. Blackshields; N. Brown; R. Chenna; P. McGettigan; H. McWilliam; F. Valentin; I. Wallace; A. Wilm; R. Lopez; J. Thompson; T. Gibson; D. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23 (21): 2947–2948.
- Lessa, E.; J. Cook; J. Patton. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. PNAS 100 (18): 10331–10334.
- Librado, P.; J. Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452

- Lougheed, S.; C. Gascon; D. Jones; J. Bogart; P. Boag. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). Proc. R. Soc. Lond. B 266: 1829-1835.
- Lovejoy, N.; J. Albert; W. Crampton. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. Journal of South American Earth Sciences 21: 5–13.
- Lundberg, J.; L. Marshall; J. Guerrero; B. Horton; M. Malabarba; F. Wesselingh. 1998. The stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers, p. 13-48. In: Phylogeny and Classification of neotropical fishes. L. Malabarba; R. Reis; R. Vari; Z. Lucena; C. Lucena (eds.). Edipucrs, Porto Alegre.
- Lydeard, C.; W. Holznagel; M. Schnare; R. Gutell. 2000. Phylogenetic analysis of molluscan mitochondrial LSU rDNA sequences and secondary structures. Molecular phylogenetics and evolution. 15(1): 83-102.
- Lydeard, C.; R. Cowie; W. Ponder; A. Bogan; P. Bouchet; S. Clark; K. Cummings; T. Frest; O. Gargominy; D. Herbert; R. Hershler; K. Perez; B. Roth; E. Strong; F. Thompson. 2004. The Global Decline of Nonmarine Mollusks. BioScience 54 (4): 321-330.
- Margulis, L.; D. Sagan. 2001. Marvellous microbes. Resurgence 206: 10–12.
- Mata, H. 2005. História evolutiva das espécies não-andinas de *Scytalopus* inferida através da variabilidade no DNA mitocondrial. Tese de Doutorado. Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Matocq, M. ; J. Patton ; M. da Silva. 2000. Population genetic structure of two ecologically distinct amazonian spiny rats: separating history and current ecology. Evolution 54 (4) : 1423–1432.

- Mayr, E. 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press. Cambridge.
- Mayr, E. 1992. A local flora and the biological species concept. American Journal of Botany 79: 222-238.
- McCarthy, C. 1996. Chromas: version 2.0. Technelysium PTY, Australia.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. Trends in Ecology & Evolution 9(10): 373-375.
- Moritz, C.; J. Patton; C. Schneider; T. Smith. 2000. Diversification of rainforest faunas: An Integrated Molecular Approach. Annu. Rev. Ecol. Syst. 31:533-563.
- Neiman, M.; C. Lively. 2004. Pleistocene glaciation is implicated in the phylogeographical structure of *Potamopyrgus antipodarum* a New Zealand snail. Molecular Ecology 13: 3085-3098.
- Nielsen, R.; J. Wakeley. 2001. Distinguishing Migration From Isolation: A Markov Chain Monte Carlo Approach. Genetics 158: 885-896.
- Nylander, J. 2004. MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html>
- d'Orbigny, A. 1835. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per American meridionalem itinere. Magazine de Zoolgie 5: 1-44.
- Page, R. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Patton, J.; M. Da Silva; J. Malcom. 1994. Gene genealogie and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: A test of the riverine barrier hypothesis. Evolution 48 (4): 1311-1323.

- Petit J., J. Jouzel, D. Raynaud, N. Barkov, J. Barnola; I. Basile, M. Bender, J. Chappellaz; J. Davis; G. Delaygue; M. Delmotte; V. Kotlyakov; M. Legrand; V. Lipenkov; C. Lorius; L. Pépin, C. Ritz; E. Saltzman; M. Stievenard. 1999. Climate and Atmospheric History of the Past 420,000 years from the Vostok Ice Core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436.
- Pfeiffer, L. 1855. Versuch einer Anordnung der Heliceen nach natürlichen Gruppen. *Malakozoologische Blätter*. 1: 221 – 223.
- Pfenninger, M.; F. Magnin. 2001. Phenotypic evolution and hidden speciation in *Candidula unifasciata* ssp. (Helicellinae, Gastropoda) inferred by 16S variation and quantitative shell traits. *Mol. Ecol.* 10: 2541–2554.
- Pfenninger, M.; D. Posada. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56 (9): 1776–1788.
- Pfenninger, M.; D. Posada; F. Magnin. 2003. Evidence for survival of Pleistocene climatic changes in Northern refugia by the land snail *Trochoidea geyeri* (Soós 1926) (Helicellinae, Stylommatophora). *BMC Evolutionary Biology* 3: 8.
- Posada, D.; K. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Posada, D.; K. Crandall. 2001. Selecting Models of Nucleotide Substitution: An Application to Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution* 18: 897-906.
- Posada, D.; T. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Primack, R.; E. Rodrigues. 2001. *Biologia da Conservação*. Londrina-Paraná, Brasil.

- Ramírez, C.; M. Salazar; E. Palma; C. Cordero; L. Mezabasso. 2008. Phylogeographical Analysis of Neotropical *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae): Did the Andes Uplift Contribute to Current Morphological Differences?. *Neotropical Entomology* 37(6): 651-661.
- Ramírez, J. 2009. Genómica evolutiva de *Bostryx aguillari* (Gastropoda: Orthalicidae), relaciones filogenéticas con otros Orthalicidos del Perú. Tesis para optar el Título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ramírez, R. 1993. A generic analysis of the family Systrophiidae (Mollusca, Gastropoda). Taxonomy, Phylogeny and Biogeography. Master Thesis on Ecology and Systematics. University of Kansas.
- Ramírez, R. 2004. Sistemática e Filogeografia dos Moluscos do Ecossistema de "Lomas" do Deserto da Costa Central do Peru. Tese do Doutorado em Zoologia. Faculdade de Biociências, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Ramírez, R.; J. Ramirez; P. Ramírez. *In Press*. The enigmatic phylogenetic position of scolodontidae: a third stylommatoporan clade?. *Ecos do XIX EBRAM* 124-131.
- Ratnasingham, S.; P. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol. Ecol. Notes*, 7: 355–364.
- Rigsby C.; E. Hemric; P. Baker. 2009. Late Quaternary Paleohydrology of the Madre de Dios River, southwestern Amazon Basin, Peru. *Geomorphology* 113: 158–172.
- Rodriguez, F.; J. Oliver; A. Marin; J. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142:485–501.
- Rogers, A; H. Harpending. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Bio. Evol.* 9(3):552-569.

- Romero, P. 2008. Diversidad y estructura genética de *Bostryx scalariformis* (Mollusca, Gastropoda) en base a polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA. Tesis para optar el Título de Biólogo con Mención en Genética y Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ross, T. 1999. Phylogeography and conservation genetics of the Iowa Pleistocene snail. *Molecular Ecology* 8 (9): 1363-1373.
- Rubinoff, D.; S. Cameron; K. Will. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *J. Hered.* 97: 581-594.
- Rull, V. 2006. Quaternary speciation in the Neotropics. *Molecular Ecology* 15: 4257-4259.
- Rundell, R.; B. Holland; R. Cowie. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the endemic Hawaiian Succineidae (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 246-255.
- Ruzzante, D.; S. Walde; V. Cussac; M. Dalebout; J. Seibert; S. Ortubay; E. Habit. 2006. Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology* 15: 2949–2968.
- Saiki, R.; D. Gelfand; S. Stoffel; S. Scharfj; R. Higuchi; G. Horn; K. Mullis; H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Salcedo, N. 2007. Speciation in Andean rivers: Morphological and genetic divergence in the catfish genus *Chaeostoma* (Teleostei: Siluriformis). PhD. Dissertation in Biology. Texas Tech University.
- Salo, J.; R. Kalliola; I. Häkkinen; Y. Mäkinen; P. Niemelä; M. Puhakka, P. Coley. 1986. River dynamics and the diversity of Amazon lowland forest. *Nature* 322: 244-258.

- Schilthuizen, M.; B. Scott; A. Cabanban; P. Craze. 2005. Population structure and coil dimorphism in a tropical land snail. *Heredity* 95: 216–220.
- Shulzitski, K.; M. McCartney; M. Burton. 2009. Population connectivity among Dry Tortugas, Florida, and Caribbean populations of mutton snapper (*Lutjanus analis*), inferred from multiple microsatellite loci. *Fish. Bull.* 107: 501–509.
- Simpson, G. 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, New York.
- Smit, S.; J. Widmann; R. Knight. 2007. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements.
- Soares-Filho, B.; D. Nepstad; L. Curran; G. Cerqueira; R. Garcia; C. Ramos; E. Voll; A. McDonald; P. Lefebvre; P. Schlesinger. 2006. Modelling conservation in the Amazon basin. *Nature* 440: 520-523.
- Solem, A. 1984. A world model of land snail diversity and abundance. p. 6 – 22. In: Solem, A.; A. van Bruggen (Eds.) *World-wide snails, Biogeographical studies on non-marine Mollusca*. Leiden: E. Brill / W. Backhuys.
- Solomon, S.; M. Bacci; J. Martins; G. Vinha; U. Mueller. 2008. Paleodistributions and Comparative Molecular Phylogeography of Leafcutter Ants (*Atta* spp.) Provide New Insight into the Origins of Amazonian Diversity. *PLoS ONE* 3 (7): e2738.
- Swofford, D. 1998. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.10b. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Takezaki, N.; A. Rzhetsky; M. Nei. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* 12: 823-833.
- Tautz, D.; P. Arctander; A. Minelli; R. Thomas; A. Vogler. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18: 70-74.



- Tamura, K; J. Dudley; M. Nei; S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thiele, J. 1926. Mollusca = Weichtiere. In: Kükenthal, W.; Krumbach, T. (Eds.), *Handbuch der Zoologie*, vol. 5 (2). De Gruyter, Berlin and Leipzig, p. 97-176.
- Thiele, J. 1927. über einige brasilianische Landschnecken. *Abh. Senck. Nat. Ges.* 40(3): 307-329, pl. 26.
- Thomaz, D.; A. Guiller; B. Clarke. 1996. Extreme Divergence of Mitochondrial DNA within Species of Pulmonate Land Snails. *Proceedings: Biological Sciences* 263 (1368): 363-368.
- Toivonen, T.; S. Mäki; R. Kalliola. 2007. The riverscape of Western Amazonia – a quantitative approach to the fluvial biogeography of the region. *J. Biogeogr.* 34: 1374-1387.
- Torrico, J.; N. Hubert; E. Desmarais; F. Duponchelle; J. Nuñez; J. Montoya-Burgos; C. Garcia; F. Carvajal-Vallejos; A. Grajales; F. Bonhomme; J. Renno. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 588–594.
- Van Riel, P.; K. Jordaens; R. Verhagen; A. Frias Martins; T. Backeljau. 2003. Genetic differentiation reflects geological history in the Azorean land snail, *Leptaxis azorica*. *Heredity* 91: 239-247.
- Wade, C.; P. Mordan. 2000. Evolution within the gastropod molluscs; using the ribosomal RNA gene-cluster as an indicator of phylogenetic relationships. *Journal of Molluscan Studies*, 66(4): 565-570.

- Wade, C.; C. Mordan; F. Naggs. 2006. Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biol. J. Lin. Soc.* 87: 593- 610.
- Waples, R.; O, Gaggiotti. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. 15: 1419-1439.
- Wesselingh, F.; J. Salo. 2006. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133: 439-458.
- Whitmore, T. 1998. Potential impact of climatic change on tropical rain forest seedlings and forest regeneration. *Climatic Change* 39(2/3): 429-438.
- Wiley, E. 1981. *Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Wiley-Interscience, New York.
- Wilkerson, R.; G. Fairchild. 1984. A checklist and generic key to the Tabanidae (Diptera) of Peru with special reference to the Tambopata Reserved Zone, Madre de Dios. *Rev. Per. Ent.* 27: 37-53.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Xia, X.; Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Zemlak, T.; E. Habit; S. Walde; M. Battini; E. Adams; D. Ruzzante. 2008. Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology* 17: 5049–5061.